

PAULO ALFONSO SCHUROFF

**Estudo sobre a adesão de *Escherichia coli*
uropatogênica com marcadores fenotípicos e
genotípicos de *E. coli* enteroagregativa a células
epiteliais**

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

São Paulo
2021

PAULO ALFONSO SCHUROFF

**Estudo sobre a adesão de *Escherichia coli* uropatogênica
com marcadores fenotípicos e genotípicos de *E. coli*
enteroagregativa a células epiteliais**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Versão corrigida

São Paulo
2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Schuroff, Paulo Alfonso

Estudo sobre a adesão de Escherichia coli uropatogênica com marcadores fenotípicos e genotípicos de E. coli enteroagregativa a células epiteliais / Paulo Alfonso Schuroff; orientador Waldir Pereira Elias Junior. -- São Paulo, 2021. 244 p.

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

1. Escherichia coli. 2. Patogenicidade. 3. Adesinas. 4. Diarreia. 5. Infecção do trato urinário. I. Elias Junior, Waldir Pereira, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Paulo Alfonso Schuroff

Título da Tese: Estudo sobre a adesão de *Escherichia coli* uropatogênica com marcadores fenotípicos e genotípicos de *E. coli* enteroagregativa a células epiteliais

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a / / , considerou

Aprovado

Reprovado

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO SOBRE A ADESÃO A CÉLULAS EPITELIAIS DE Escherichia coli UROPATOGÊNICA (UPEC) COM MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE E. coli ENTEROAGREGATIVA (EAEC)", protocolada sob o CEUA nº 2172190318, sob a responsabilidade de **Waldir Pereira Elias Junior** e equipe; *Paulo Alfonso Schuroff* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 24/05/2018.

We certify that the proposal "Study about the adherence to epithelial cells by uropathogenic Escherichia coli (UPEC) with phenotypic and genotypic markers of enteroaggregative E. coli (EAEC)", utilizing 18 Heterogenics mice (18 females), protocol number CEUA 2172190318, under the responsibility of **Waldir Pereira Elias Junior** and team; *Paulo Alfonso Schuroff* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/24/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: [36 meses](#)

Depto/Setor: [Microbiologia](#)

Origem: [Biotério Central do Instituto Butantan](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

Idade ou peso: [6 a 10 semanas](#)

Linhagem: [BALB/c](#)

N amostral: [18](#)

São Paulo, 24 de maio de 2018



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

São Paulo, 16 de março de 2020
CEUA N 2172190318

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Waldir Pereira Elias Junior
Área: Microbiologia

Título da proposta: "ESTUDO SOBRE A ADESÃO A CÉLULAS EPITELIAIS DE Escherichia coli UROPATOGÊNICA (UPEC) COM MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE E. coli ENTEROAGREGATIVA (EAEC)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 000660)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 11/dezembro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Para a execução do referido protocolo experimental animal tornou-se necessário o aumento do número de animais e a mudança da linhagem de camundongo a ser empregada. Quanto à mudança da linhagem, a justificativa é que a linhagem original (Balb/c) é muito resistente ao modelo de infecção a ser testado. Isso foi constatado após o pedido deste protocolo experimental, levando em consideração resultados discutidos com um grupo da UNESP de Araraquara, que também utiliza o modelo de ITU em camundongos, bem como após uma pesquisa mais aprofundada na literatura específica. Dessa forma, solicitamos a mudança para a linhagem Black-C57 (C57/BL6) SPF (specific pathogen free), onde o modelo pode funcionar mais efetivamente. O protocolo aprovado compreendia o número de 18 camundongos Balb/c para avaliar 3 grupos experimentais com 6 animais em cada grupo. Para um melhor processamento estatístico dos dados foi necessário elevar o número de 6 animais por grupo para 10 animais, além de incluir mais 3 grupos experimentais de 10 animais, ou seja, o número total de animais passará para 60, visto que são 6 grupos experimentais de 10 camundongos cada. Nos grupos experimentais, além da cepa selvagem (UPEC46), serão avaliadas as cepas mutantes e mutantes complementados, para análise do papel das fímbrias do tipo I e Afp (Aggregate Forming Pilus) na uropatogênese da cepa bacteriana em estudo. Esclarecemos que o protocolo previamente aprovado NÃO foi executado até o presente momento."

Comentário da CEUA: "".



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel da fimbria AFP na colonização intestinal", protocolada sob o CEUA nº 9627230920, sob a responsabilidade de **Waldir Pereira Elias Junior** e equipe; *Paulo Alfonso Schuroff* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 26/11/2020.

We certify that the proposal "Role of AFP fimbriae in intestinal colonization", utilizing 1 Lagomorph (1 females), 60 Isogenics mice (60 females), protocol number CEUA 9627230920, under the responsibility of **Waldir Pereira Elias Junior** and team; *Paulo Alfonso Schuroff* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 11/26/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: **8 meses**

Depto/Setor: [Microbiologia](#)

Origem: [Biotério Central do Instituto Butantan](#)

Espécie: [Lagomorfo](#)

sexo: [Fêmeas](#)

Idade ou peso: [2500 a 3000 g](#)

Linhagem: [Branco Nova Zelandia](#)

N amostral: [1](#)

Origem: [Biotério Central FMUSP](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

Idade ou peso: [17 a 20 g](#)

Linhagem: [BALB/c \(SPF\)](#)

N amostral: [60](#)

São Paulo, 27 de abril de 2021



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

**Dedico este trabalho à
minha mãe (Andréia A. C.
Schuroff) e a meu pai
(Alfonso Schuroff) por
sempre me apoiarem,
acreditarem em meu
potencial e me
incentivarem em todos os
momentos de minha vida**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer imensamente ao meu orientador Dr. Waldir Pereira Elias Junior. Muito obrigado por confiar esse projeto a mim, por me ajudar na realização de todos esses experimentos e por estar sempre comigo nessa jornada de cinco anos. Muito obrigado por tudo!!!

À Dra. Cecília M. Abe por me ajudar com diversos experimentos, além da obtenção das imagens de microscopia eletrônica. Sou muito grato pelo seu empenho com esse projeto e por me ajudar inúmeras vezes e me incentivar a fazer o intercâmbio.

À Dra. Tânia A. T. Gomes do Amaral por permitir que continuasse o projeto da cepa UPEC-46, por sempre me incentivar e ajudar em todos os momentos que precisei.

Ao Dr. Ulrich Dobrindt por me receber em seu laboratório na Alemanha e propiciar que eu realizasse todas as belas análises de bioinformática. Também agradeço a sua família por me receber inúmeras vezes em sua casa.

Vielen lieben Dank für alles.

Ao Dr. Enéas de Carvalho por me ensinar os caminhos da bioinformática e por me ajudar no sequenciamento Illumina e todas as análises genômicas iniciais.

Aos meus pais (Andréia A. C. Schuroff e Alfonso Schuroff) e a minhas irmãs Hana P. Schuroff e Karoline por sempre estarem comigo em todos os momentos. Sou extremamente grato a vocês, pois graças a vocês que conquistei essa tese.

À minha namorada Dra. Fernanda B. de Andrade por me incentivar e estar em todos os momentos bons e difíceis comigo. Obrigado pela ajuda, dicas e conselhos. Seu trabalho de mestrado me inspirou a estudar o patótipo EAEC e foi a base do meu mestrado. Sou cada dia melhor graças a você!!!

À Halleluya T. Wami por me ajudar e dar um enorme suporte nas análises de bioinformática realizadas na Alemanha.

Ao Jonatas W. Silva por me ajudar em todos os experimentos envolvendo animais e sempre colaborar no desenvolvimento desse projeto.

Aos meus amigos do laboratório de bacteriologia e colegas de bancada Dra. Claudia Freire, Dra. Claudia Trigo, Alexandra, Gabriel, Dr. Roberto, Matilde e Dra. Kamila pelos inúmeros bons momentos que tivemos e por sempre estarem comigo nesses cinco anos.

À Dr. Fabia A. Salvador e Dr. Rodrigo T. Hernandez obrigado por iniciarem este projeto e obterem todos os importantes resultados iniciais na qual deram base a essa tese.

À secretária Martina Steffen e demais colegas do Laboratório de Plasticidade do Genoma Microbiano (Münster, Alemanha) por me auxiliarem e me ajudarem em diversos momentos.

À Dra. Hedwig Roderfeld e Anja G. Lorenz do centro Brasil-Alemanha por me proporcionarem uma bolsa de estudos para Münster e por me auxiliarem durante todo meu período de instalação.

À Alexandra Marzinek-Welslau e seu filho Joshua por me receberem em sua casa e por me ajudarem durante todo o período de estadia na Alemanha.

À Dra. Marcia R. Franzolin por ceder seu laboratório a diversos experimentos realizados e os inúmeros auxílios prestados.

Ao Ricardo e Dra. Maria Leonor por me auxiliarem nos experimentos do biotério NB2.

Aos funcionários e pesquisadores dos Laboratórios de Bacteriologia 1 e 2 (Instituto Butantan) por me ajudarem em vários momentos.

Aos alunos do Laboratório de Bacteriologia e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

MUITO OBRIGADO!!!

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

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

Além disso, parte desse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Plasticidade do Genoma Microbiano, no Instituto para Higiene da Universidade de Münster (Alemanha) e financiado por uma bolsa do Centro Brasil da Universidade de Münster, sob os auspícios do Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico (DAAD) e do Ministério Federal Alemão de Educação e Pesquisa.

“This work was supported by a grant from the Brazil Centre of the University of Münster, under the auspices of the German Academic Exchange Service (DAAD) and the German Federal Ministry of Education and Research.”

RESUMO

SCHUROFF, P. A. **Estudo sobre a adesão de *Escherichia coli* uropatogênica com marcadores fenotípicos e genotípicos de *E. coli* enteroagregativa a células epiteliais.** 2021. 244 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um importante patotipo diarreiogênico, enquanto *E. coli* uropatogênica (UPEC) é o agente mais importante de infecção do trato urinário (ITU). Nos últimos anos, fatores de virulência de EAEC têm sido detectados em cepas de *E. coli* causadoras de ITU, mostrando a importância dessas cepas híbridas. Nesse sentido, um estudo prévio identificou a presença de marcadores genéticos de EAEC (*aatA*, *aap* e *pet*) e o padrão de adesão agregativa (AA) na cepa UPEC-46, isolada de ITU. No presente estudo, a cepa UPEC-46 foi analisada genotípica e fenotipicamente com o objetivo de identificar a(s) adesina(s) responsável(is) pelo estabelecimento do padrão AA e seu papel na patogênese bacteriana. O fenótipo AA foi observado para a UPEC-46 nos ensaios de adesão com as linhagens de células HeLa, HT-29 e 5637, após 3 ou 6 h de interação bactéria-células; entretanto, a formação de biofilme não foi detectada sob diferentes condições de cultivo ou superfícies abióticas. Adicionalmente, foram detectadas as produções de curli, celulose, bacteriocinas, toxina Pet e de resistência à atividade bactericida do soro humano. O genoma completo dessa cepa foi sequenciado e as análises de bioinformática mostraram que essa cepa está filogeneticamente relacionada a cepas de EAEC atípicas, isoladas de fezes humanas e com perfis de virulência semelhantes. As sequências de três plasmídios foram identificadas e montadas. No plasmídio p46-1, de maior peso molecular (~135 kb), foram localizados os genes de EAEC (*aatA*, *pet* e *aap*) e os genes responsáveis pela biogênese do *pilus* denominado *aggregate-forming pili* (AFP). No plasmídio p46-2 (~109 kb) foram identificados os genes de resistência a antimicrobianos e no plasmídio p46-3 (~9 kb) os genes responsáveis pela síntese da colicina E1. A mutação no gene *afpA*, que codifica a pilina de AFP, na UPEC-46 levou à perda de produção e montagem dessa fímbria e redução significativa na adesão às células epiteliais. Para identificar outras possíveis adesinas envolvidas no padrão AA produzido pela UPEC-46, uma biblioteca de mutantes usando o *transposoma* *EZ-Tn5* <R6K γ ori/KAN-2> foi obtida e os mutantes analisados. As inserções do *transposon* foram sequenciadas nos mutantes não aderentes, identificando genes relacionados à síntese de lipopolissacarídeos,

metabolismo/transportadores celulares e às adesinas AFP e fímbria tipo 1. Construções genéticas a partir da cepa selvagem UPEC-46 mutagenizando os genes *afpA* (pilina da AFP) e *fimH* (pilina da fímbria tipo 1) foram analisadas em modelos *in vitro* (adesão e invasão) e *in vivo* (colonização intestinal em camundongos BALB/c e infecção ascendente do trato urinário em camundongos C57/BL6). Foi evidenciado o efeito sinérgico das adesinas AFP e fímbria tipo 1 no estabelecimento da aderência e na capacidade de invasão utilizando as linhagens celulares HeLa, HT-29 e 5637. Além disso, ambas as adesinas atuaram de forma conjunta na colonização intestinal e do trato urinário nos modelos murinos. Em conclusão, os dados obtidos no presente estudo permitem classificar a UPEC-46 como uma cepa híbrida patogênica que expressa a fímbria AFP, a qual apresenta papel essencial nos processos de adesão *in vitro* e de colonização intestinal e do trato urinário *in vivo*.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Patogenicidade. Adesinas. Diarreia. Infecção do trato urinário.

ABSTRACT

SCHUROFF, P. A. **Study about the adherence to epithelial cells by uropathogenic *Escherichia coli* with phenotypic and genotypic markers of enteroaggregative *E. coli*.** 2021. 244 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an important diarrheagenic pathotype, while uropathogenic *E. coli* (UPEC) is the most important agent of urinary tract infection (UTI). Recently, EAEC virulence factors have been detected in *E. coli* strains causing UTI, showing the importance of these hybrid strains. In this sense, a previous study identified the presence of EAEC genetic markers (*aatA*, *aap* and *pet*) and the aggregative adhesion (AA) pattern in the UPEC-46 strain, isolated from UTI. In this study, the UPEC-46 strain was analyzed genotypically and phenotypically in order to identify the adhesin(s) responsible for establishing the AA pattern and its(their) role in pathogenesis. The AA pattern was observed for UPEC-46 in the adhesion assays using HeLa, HT-29 and 5637 cell lineages, after 3 or 6 h of bacterial-cell interaction. However, biofilm formation was not detected using different growth conditions or abiotic surfaces. Additionally, production of curli, cellulose, bacteriocins and Pet toxin were detected and the UPEC-46 was capable to resist to the bactericidal activity of normal human serum. The complete genome of UPEC-46 was sequenced, and bioinformatics analyzes showed that this strain is phylogenetically related to atypical EAEC strains, isolated from human feces with similar virulence profiles. The sequences of three plasmids were identified and assembled. The plasmid p46-1, presenting the higher molecular weight (~135 kb), harbors the EAEC genes (*aatA*, *pet* and *aap*) and the genes responsible for the pilus biogenesis called aggregate-forming pili (AFP). In the plasmid p46-2 (~109 kb), genes encoding for antimicrobial resistance were identified; while the plasmid p46-3 (~9 kb) harbors the genes responsible for the synthesis of colicin E1. The mutation of *afpA*, the gene encoding the AFP pilin, led to loss of production and assembly of this fimbria and a significant reduction in the adherence to epithelial cells in the UPEC-46. To identify other possible adhesins involved in the AA pattern produced by UPEC-46, a library of mutants using the transposome *EZ-Tn5* <*R6K**γori*/*KAN-2*> was obtained and the mutants analyzed. Transposon insertions were sequenced in non-adherent mutants, identifying genes related to the synthesis of lipopolysaccharides, metabolism/cellular transporters and the adhesins AFP and type 1 fimbriae. Genetic constructions from the wild-type strain

(UPEC-46) mutating the *afpA* (AFP pilin) and *fimH* (type 1 fimbriae pilin) genes were analyzed *in vitro* (adhesion and invasion) and *in vivo* (intestinal colonization in BALB/c mice and ascending urinary tract infection in C57/BL6 mice). It was evidenced the synergistic effect of AFP and type 1 fimbriae adhesins in the adherence and invasion phenotypes using HeLa, HT-29 and 5637 cell lineages. In addition, both adhesins acted together in intestinal and urinary tract colonization using murine models. In conclusion, the data obtained in the present study allow us to classify the UPEC-46 as a hybrid-pathogenic strain that expresses the AFP fimbriae, which plays an essential role in the processes of adhesion *in vitro* and intestinal and urinary tract colonization *in vivo*.

Keywords: *Escherichia coli*. Pathogenesis. Adhesins. Diarrhea. Urinary tract infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Padrão de adesão agregativa	26
Figura 2 - Principais fatores de virulência envolvidos na patogênese de EAEC.....	31
Figura 3 - Principais fatores de virulência associados a UPEC	34
Figura 4 - Padrão de adesão e perfil plasmidial da cepa UPEC-46.....	42
Figura 5 - Filograma e características genéticas de cepas EAEC e UPEC	44
Figura 6 - Padrão de adesão da cepa UPEC-46 em células epiteliais cultivadas ...	90
Figura 7 - Quantificação da adesão da cepa UPEC-46 em células epiteliais cultivadas	91
Figura 8 - Quantificação de invasão da cepa UPEC-46 em células epiteliais cultivadas	92
Figura 9 - Quantificação da formação de biofilme pela cepa UPEC-46.....	93
Figura 10 - Cinética da formação de biofilme	94
Figura 11 - Análise da expressão da fímbria curli e produção de celulose pela cepa UPEC-46	95
Figura 12 - Análise da produção de hemolisinas pela cepa UPEC-46	96
Figura 13 - Análise da produção de bacteriocinas pela cepa UPEC-46	97
Figura 14 - Ensaio de resistência à ação bactericida do soro pela cepa UPEC-46..	98
Figura 15 - Imunodeteção da proteína Pet a partir do sobrenadante de cultura bacteriana da cepa UPEC-46	99
Figura 16 - Estrutura dos três plasmídios presente na cepa UPEC-46	104
Figura 17 - Filograma da cepa UPEC-46 e das diferentes cepas de referência de <i>E. coli</i>	106
Figura 18 - Filograma e características genéticas da cepa UPEC-46 e de cepas EAEC e UPEC	108
Figura 19 - Filograma e características genéticas da cepa UPEC-46 e de cepas de <i>E. coli</i> pertencentes ao ST10.....	110
Figura 20 - Visão geral esquemática da estrutura do <i>operon afp</i> da cepa UPEC-46	111
Figura 21 - Filograma das cepas de <i>E. coli</i> AFP+	119
Figura 22 - <i>Heat map</i> indicando a presença ou ausência de fatores de virulência em diferentes cepas de <i>E. coli</i> AFP+	121

Figura 23 - Localização no gene <i>afpA</i> e amplificação do fragmento interno <i>afpA</i> ₁ na cepa UPEC-46	123
Figura 24 - PCR para detecção do fragmento interno <i>afpA</i> ₁ nos transformantes selecionados	124
Figura 25 - Perfil de restrição do plasmídeo pPAS1 da cepa DH5α (pPAS1) com a enzima de restrição EcoRI	125
Figura 26 - Detecção do gene <i>afpB</i> nos transconjugantes selecionados	126
Figura 27 - Confirmação da recombinação homóloga nas cepas transconjugantes por PCR.....	127
Figura 28 - Esquema da recombinação homóloga de pPAS2 na cepa UPEC-46 ..	128
Figura 29 - Construção do plasmídeo de completação para a mutação no gene <i>afpA</i>	129
Figura 30 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> e UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) em células HeLa na presença de D-manose	131
Figura 31 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> e UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) em células HT-29 na presença de D-manose.....	132
Figura 32 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> e UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) em células 5637 na presença de D-manose.....	133
Figura 33 - Análise por <i>immunoblotting</i> dos soros pré-imune e anti-UPEC-46 adsorvido.....	134
Figura 34 - MET com imunomarcção com os soros pré-imune e anti-AFP	135
Figura 35 - Perfis de adesão às células HeLa dos mutantes selecionados da biblioteca EZ-Tn5.....	137
Figura 36 - Curvas de crescimento dos mutantes que perderam a capacidade de adesão agregativa.....	139
Figura 37 - Ensaios de motilidade dos mutantes que perderam a capacidade de adesão agregativa.....	140
Figura 38 - Esquema das diferentes construções realizadas para análise do padrão AA na patogênese da cepa UPEC-46.....	143
Figura 39 - Gene <i>fimH</i> e produto da amplificação do fragmento <i>fimH:clo</i>	144
Figura 40 - Confirmação da recombinação homóloga por PCR no gene <i>fimH</i>	145
Figura 41 - Esquema da mutagênese pelo sistema λ Red usado na mutação do gene <i>fimH</i> da cepa UPEC-46:: <i>afpA</i>	146

Figura 42 - Curvas de crescimento das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i> em diferentes meios de cultura	148
Figura 43 - Ensaios de motilidade das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i>	149
Figura 44 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i> em células HeLa	151
Figura 45 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i> em células HT-29	152
Figura 46 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i> em células 5637	153
Figura 47 - Capacidade de invasão das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i> em diferentes linhagens celulares	154
Figura 48 - Capacidade de colonização intestinal das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i> em camundongos BALB/c tratados com estreptomicina	156
Figura 49 - Avaliação da colonização intestinal em diferentes porções do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) após inoculação da UPEC-46 em camundongos BALB/c.....	158
Figura 50 - Capacidade das cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i> de colonizar o cólon de camundongos BALB/c	159
Figura 51 - Colonização de órgãos do trato urinário de camundongos C57BL/6 após inoculação transuretral com as cepas UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i>	160
Figura 52 - Colonização da bexiga e rins de camundongos C57BL/6 após inoculação transuretral com a cepa UPEC-46.....	161
Figura 53 - Modelo esquemático do papel proposto para cepas positivas as adesinas AFP e fimbria tipo 1 na colonização bacteriana	176

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das cepas bacterianas e plasmídios utilizados neste estudo.....	49
Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo..	53
Tabela 3 - Principais características do genoma da cepa UPEC-46.....	100
Tabela 4 - Fatores de virulência identificados na cepa UPEC-46.....	101
Tabela 5 - Sequências de fagos detectados no genoma da cepa UPEC-46.....	103
Tabela 6 - Predição das funções das proteínas codificadas pelo <i>operon afp</i> da cepa UPEC-46 e domínios conservados presentes.....	112
Tabela 7 - Características gerais das 25 cepas <i>E. coli</i> AFP+.....	113
Tabela 8 - Identidade de alinhamento de nucleotídeos (em %) dos genes do <i>operon afp</i> das cepas encontradas no NCBI com os genes do <i>operon afp</i> da cepa UPEC-46.....	115
Tabela 9 - Caracterização genotípica das cepas AFP+.....	117
Tabela 10 - Locais de inserção, grupos e função das inserções dos clones negativos ao fenótipo AA.....	138
Tabela 11 - Capacidade de aglutinação da cepa UPEC-46 e dos clones negativos ao fenótipo AA.....	142
Tabela 12 - Capacidade de aglutinação da cepa UPEC-46, UPEC-46:: <i>afpA</i> , UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3) e UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i>	149

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 <i>Escherichia coli</i>	23
1.2 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	25
1.3 <i>E. coli</i> uropatogênica (UPEC)	33
1.4 Cepas de <i>E. coli</i> híbridas e heteropatogênicas	39
1.5 <i>E. coli</i> UPEC-46	41
2 OBJETIVOS	46
2.1 Gerais	46
2.2 Específicos	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Cepas bacterianas e plasmídios	48
3.2 Condições de cultivo e manutenção das cepas bacterianas	51
3.3 Técnicas de biologia molecular	51
3.3.1 <i>Extração de DNA genômico</i>	51
3.3.2 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	51
3.3.3 <i>Eletroforese em gel de agarose e determinação da concentração de DNA</i>	54
3.3.4 <i>Extração do DNA plasmidial</i>	54
3.3.5 <i>Transformação bacteriana</i>	55
3.3.6 <i>Sequenciamento por Sanger e análise das sequências de DNA</i>	56
3.4 Ensaio de interação com células epiteliais <i>in vitro</i>	56
3.4.1 <i>Manutenção das células e preparo das microplacas</i>	56
3.4.2 <i>Ensaio qualitativo de adesão</i>	57
3.4.3 <i>Ensaio quantitativos de adesão e invasão</i>	58
3.5 Ensaio de formação de biofilme	59
3.5.1 <i>Formação de biofilme utilizando diferentes superfícies e meios de cultivo</i>	59
3.5.2 <i>Cinética da formação de biofilme</i>	60
3.6 Análise da expressão de curli	61
3.7 Produção de celulose	62
3.8 Ensaio de produção de hemolisinas	62
3.9 Análise da produção de bacteriocinas	62
3.10 Resistência à atividade bactericida do soro	63
3.11 Imunodeteção da proteína Pet	63

3.12 Sequenciamento do genoma completo da cepa UPEC-46	65
3.13 Montagem do genoma	67
3.14 Anotação e análises genômicas	67
3.15 Análises filogenéticas baseadas em SNP	68
3.16 Análises <i>in silico</i> para AFP	70
3.16.1 <i>Pesquisa das cepas AFP positivas</i>	70
3.16.2 <i>Identificação de genes associados à virulência</i>	70
3.17 Construção da cepa mutante em <i>afpA</i> utilizando o vetor pJP5603	71
3.17.1 <i>Obtenção do inserto, clonagem, transformação e seleção de clones contendo o inserto <i>afpA</i> no vetor pGEM-T Easy</i>	71
3.17.2 <i>Subclonagem, transformação e seleção de clones contendo o inserto <i>afpA</i> no vetor pJP5603</i>	72
3.17.3 <i>Conjugação da amostra S17-1(λpir)(pPAS2) com a cepa UPEC-46</i>	73
3.17.4 <i>Ensaio para a confirmação da mutação isogênica de <i>afpA</i></i>	73
3.18 Construção do plasmídio de complementação em <i>afpA</i>	74
3.19 Produção e adsorção de soro policlonal anti-AFP em coelhos	75
3.19.1 <i>Produção do soro anti-UPEC-46</i>	75
3.19.2 <i>Produção do soro anti-AFP após adsorção</i>	76
3.19.3 <i>Immunoblotting dos soros pré-imune e anti-AFP</i>	76
3.19.4 <i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET) com imunomarcação com o soro anti-Afp</i>	77
3.20 Ensaio de mutagênese com o transposon <i>EZ-Tn5</i>	78
3.20.1 <i>Construção da biblioteca de mutantes</i>	78
3.20.2 <i>Análise fenotípica da biblioteca de mutantes</i>	79
3.20.3 <i>Mapeamento da transposição</i>	79
3.21 Mutação do gene <i>fimH</i> pelo sistema λRed	80
3.21.1 <i>Obtenção do fragmento <i>fimH:clo</i></i>	80
3.21.2 <i>Inserção dos genes que codificam as recombinases</i>	81
3.21.3 <i>Transformação fragmento <i>fimH:clo</i> e seleção das cepas recombinantes</i>	81
3.21.4 <i>Ensaio para a confirmação da mutação do gene <i>fimH</i></i>	82
3.22 Análises fenotípicas das cepas mutantes e complementadas	82
3.22.1 <i>Curva de crescimento</i>	82
3.22.2 <i>Ensaio de motilidade</i>	83
3.22.3 <i>Análise da expressão da fímbria tipo 1</i>	83

3.23 Ensaio <i>in vivo</i> com a cepa UPEC-46 e construções derivadas	83
3.23.1 Modelo de colonização intestinal em camundongos tratados com o antibiótico estreptomicina	84
3.23.2 Modelo murino de infecção ascendente do trato urinário.....	85
3.23.3 Análises por microscopia eletrônica	87
3.23.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	87
3.23.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	88
3.24 Análises estatísticas	88
4 RESULTADOS	89
4.1 Características fenotípicas da cepa UPEC-46	89
4.1.1 Análise da adesão e capacidade de invasão nas linhagens celulares HeLa, HT-29 e 5637	89
4.1.2 Capacidade de formação de biofilme	92
4.1.3 Análise da expressão da fímbria curli e produção de celulose.....	94
4.1.4 Produção de hemolisinas	95
4.1.5 Produção de bacteriocinas.....	96
4.1.6 Resistência à ação bactericida do soro humano normal	97
4.1.7 Análise da produção da toxina Pet.....	98
4.2 Características genotípicas da cepa UPEC-46	99
4.2.1 Sequenciamento e pesquisa de fatores de virulência	99
4.2.2 Análise da presença de sequências de fagos	102
4.2.3 Análises dos plasmídios.....	103
4.2.4 Análises filogenéticas.....	105
4.3 Caracterização genotípica de AFP	111
4.3.1 Análises <i>in silico</i> e identidade da sequência dos genes de AFP.....	111
4.3.2 Perfis de virulência das cepas AFP positivas.....	119
4.4 Papel de AFP na patogênese da cepa UPEC-46	123
4.4.1 Construção da cepa mutante em <i>afpA</i>	123
4.4.2 Construção da cepa complementada em <i>afpA</i>	128
4.4.3 Análise da interação com células epiteliais <i>in vitro</i>	130
4.5 Análise ultraestrutural de AFP	134
4.5.1 Avaliação por immunoblotting do soro anti-AFP.....	134
4.5.2 Identificação das estruturas de superfície bacteriana reconhecidas pelo soro anti-UPEC-46 adsorvido.....	135

4.6 Pesquisa das adesinas associadas ao fenótipo AA na biblioteca de mutantes <i>EZ-Tn5</i>	136
4.6.1 <i>Identificação dos genes envolvidos no fenótipo AA</i>	136
4.6.2 <i>Caracterização fenotípica dos mutantes</i>	139
4.7 Papel das adesinas associadas ao fenótipo AA na patogênese da amostra UPEC-46	142
4.7.1 <i>Construção da cepa duplo mutante pelo sistema λRed</i>	143
4.7.2 <i>Caracterização fenotípica das diferentes construções</i>	147
4.7.3 <i>Análises de interação com diferentes linhagens de células epiteliais</i>	150
4.7.4 <i>Modelo animal de colonização intestinal</i>	155
4.7.5 <i>Modelo animal de ITU por meio da colonização de rins e bexiga</i>	159
5 DISCUSSÃO	162
6 CONCLUSÕES	177
REFERÊNCIAS*	178
APÊNDICES	210
APÊNDICE A – Tabela com características gerais das linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas para a construção da primeira árvore filogenética (Figura 17)	211
APÊNDICE B – Tabela com características gerais das linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas para a construção da segunda árvore filogenética (Figura 18).....	213
APÊNDICE C – Tabela com características gerais das linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas para a construção da terceira árvore filogenética (Figura 19)	215
APÊNDICE D – Fatores de virulência presentes na cepa UPEC-46.....	218
APÊNDICE E – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene <i>afpA</i> de diferentes cepas AFP ⁺	224
APÊNDICE F – Alinhamento da sequência de aminoácidos para o gene <i>afpA</i> de diferentes cepas AFP ⁺	228
APÊNDICE G – Visão geral dos fatores de virulência usados para a criação do <i>heat map</i>	230

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* é uma bactéria Gram negativa altamente versátil descrita primeiramente em 1885 pelo bacteriologista alemão Theodore Escherich, sendo inicialmente denominada como “*Bacterium coli comune*”. *E. coli* é um microrganismo bacilar, anaeróbio facultativo, não esporulante, pertencente à família Enterobacteriaceae, que coloniza o trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, sendo a espécie comensal predominante nesses (BOOP et al., 2003; EWING, 1986).

Embora grande parte das cepas de *E. coli* façam parte da microbiota intestinal e proporcionem benefícios a seus hospedeiros, alguns clones, ao longo da evolução, foram capazes de adquirir fatores de virulência por meio de elementos genéticos móveis como ilhas de patogenicidade, sequências de inserção ou plasmídios, e com isso se adaptarem a novos nichos e causarem um amplo espectro de doenças (CROXEN; FINLAY, 2010; DOBRINDT et al., 2004; VILA et al, 2016). Assim, cepas patogênicas de *E. coli* podem provocar tanto doenças intestinais quanto extraintestinais em humanos, onde as condições clínicas mais comuns incluem: diarreia/disenteria, infecção do trato urinário (ITU), sepse e meningite (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RUSSO; JOHNSON, 2000).

As populações de *E. coli* apresentam diversas estruturas clonais, observadas por meio da presença de diferentes genótipos e fenótipos (SELANDER; LEVIN, 1980). As diferentes cepas de *E. coli* compartilham de uma origem ancestral comum, divergindo entre si por meio de processos evolutivos (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012). Durante os últimos anos, vários métodos de tipagem molecular foram desenvolvidos, revelando que isolados de *E. coli* que apresentam diferentes estruturas clonais, podem ser classificadas em diferentes grupos filogenéticos (OCHMAN; SELANDER, 1984; RASKO et al., 2008).

A distribuição em filogrupos tem sido utilizada como uma maneira rápida e simples de classificar cepas de *E. coli* patogênicas, além de demonstrar que cepas de diferentes filogrupos diferem quanto as suas características fenotípicas e genotípicas, nichos ecológicos e habilidade em causar doenças (CLERMONT et al., 2013; CLERMONT et al., 2019). Análises filogenéticas por meio da técnica desenvolvida por

Clermont et al. (2000), e aprimorada em estudos posteriores do mesmo grupo, têm demonstrado que as cepas de *E. coli* atualmente são classificadas em oito grupos filogenéticos denominados A, B1, B2, C, D, E, F e G.

Além disso, embora o método desenvolvido por Clermont seja amplamente utilizado, técnicas de análises filogenéticas mais precisas como o *multilocus sequence typing* (MLST), baseada na análise do sequenciamento de genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo bacteriano, também têm sido utilizadas para uma análise mais exata das cepas de *E. coli* quanto a sua filotipagem (GORDON et al., 2008).

O grupo das *E. coli* associadas à infecção intestinal é conhecido como *E. coli* diarreio gênica (DEC). As cepas de DEC são consideradas um dos mais importantes agentes etiológicos de diarreia/disenteria e os episódios diarreicos devido a estas cepas são tidos como um importante problema de saúde pública entre crianças e adultos nos países em desenvolvimento, principalmente devido à associação com morbidade e mortalidade de crianças com menos de cinco anos de idade (GOMES et al., 2016).

As cepas classificadas como DEC estão agrupadas em cinco patótipos distintos denominados: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (GOMES et al., 2016; NATARO; KAPER, 1998). Embora essa classificação seja a mais amplamente empregada, outros patótipos menos definidos também têm sido reportados, como a *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) e a *E. coli* aderente invasora (AIEC), associada à doença de Crohn (CLEMENTS et al., 2012; CROXEN et al., 2013).

Doenças extraintestinais causadas por *E. coli* são comuns em várias faixas etárias e podem envolver qualquer órgão ou sítio anatômico (MANGES et al., 2019). Cepas associadas a estas infecções são conhecidas como *E. coli* extraintestinais (ExPEC) e, embora façam parte da microbiota intestinal, colonizando o intestino humano de forma assintomática, ao alcançarem nichos fora do intestino são capazes de causar diversas doenças, como por exemplo, ITU, sepse, meningite e doenças sistêmicas (KÖHLER; DOBRINDT, 2011).

Os patótipos de ExPEC mais comumente estudados incluem: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (MNEC) e *E. coli*

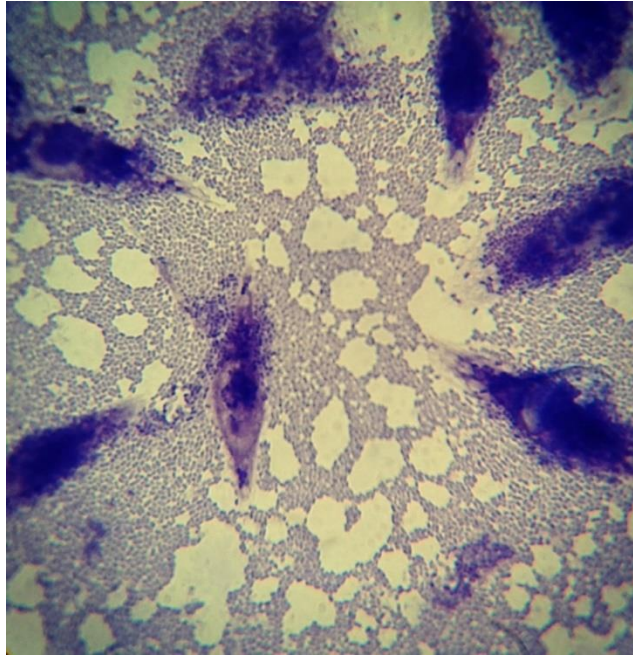
causadora de sepse (SEPEC) (JOHNSON; RUSSO, 2002; RUSSO; JOHNSON, 2000; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007). Além disso, outros patótipos de ExPEC também têm sido descritos na literatura, incluindo *E. coli* patogênica aviária (APEC) (ANTÃO et al., 2008), *E. coli* patogênica mamária (MPEC) (SHPIGEL; ELAZAR; ROSENHINE, 2008) e *E. coli* patogênica endometrial (EnPEC) (SHELDON et al., 2010).

1.2 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC é identificada como um patótipo de DEC que apresenta a capacidade de produzir o padrão de adesão agregativa (AA) em células epiteliais cultivadas. Este padrão foi inicialmente descrito por Nataro et al. (1987), ao caracterizar cepas de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda na infância conduzido no Chile.

O padrão AA tem como característica a formação de agregados bacterianos que se assemelham a “tijolos empilhados” e pode ser observado *in vitro* e *ex vivo* (ANDRADE; FREYMÜLLER; FAGUNDES-NETO, 2010, 2011; BRAGA et al., 2017; HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996). Em células epiteliais em cultura, o padrão AA pode apresentar variantes com as bactérias aderidas predominantemente nas células epiteliais e/ou à superfície da lamínula, em arranjos análogos a favos de colmeia (**Figura 1**) (GOMES et al., 2016; HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; NATARO; KAPER, 1998; NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

Figura 1 – Padrão de adesão agregativa



Reproduzido de Schuroff (2016).

Padrão AA apresentado por uma cepa de EAEC em cultura semi-confluyente de células HEp-2 (ATCC CCL-23) após 6 h de incubação na presença de 1% de D-manose. Pode-se observar a presença de bactérias formando agregados, aderidos na superfície da lamínula e das células. A lamínula foi corada com May-Grünwald/Giemsa e observada em microscópio ótico comum. Aumento: 1.000 X.

Dentre os patotipos de DEC, EAEC destaca-se por ser amplamente detectada em estudos epidemiológicos ao redor do mundo, apresentando-se como um dos principais enteropatógenos isolados (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014). Estudos epidemiológicos conduzidos no Brasil (ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; DIAS et al., 2016; LOPES, 2015; LOZER et al., 2013) e em outros países (BEN SALEM-BEN NEJMA et al., 2014; HUANG et al., 2006; OPINTAN et al., 2010; SARANTUYA et al., 2004) classificam EAEC como o patotipo mais comumente isolado de crianças com diarreia aguda. Além disso, EAEC também é um importante patógeno associados a casos de diarreia persistente, ou seja, com duração superior a 14 dias (LIMA et al., 1992; OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

Alta prevalência de cepas EAEC também foi verificada em fezes de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (BURGOS, 2017; MEDINA et al., 2010), em casos de diarreia do viajante em adultos que retornaram de viagens a países em desenvolvimento (HUANG et al., 2007; PASCHKE et al., 2011). Além disso, foi associada a surtos de diarreia ocasionados pela ingestão de alimentos contaminados (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; HARADA et al.,

2007; ITOH et al., 1997; SCAVIA et al., 2008). Cepas de EAEC também foram detectadas em amostras de água destinadas ao consumo humano (DA SILVA et al., 2019; SCHUROFF, 2016) e em água utilizada para a produção de alimentos (AIJUKA et al., 2018), o que pode facilitar surtos de origem alimentar.

Nos últimos anos o patotipo EAEC tem sido associado a casos de ITU e sepse (ABE et al., 2008; GUIRAL et al., 2018; LARA et al., 2017; MANDOMANDO et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021; NAZEMI et al., 2011; PARK et al., 2009; TOVAL et al., 2014). Em um estudo dinamarquês conduzido por Olesen et al. (1994) foi relatado um surto comunitário de ITU na cidade de Copenhague, Dinamarca, em 18 infectados por cepas de *E. coli* positivas para marcadores de virulência associados à EAEC e ExPEC (OLESEN et al., 2012). Adicionalmente, um isolado representativo do surto (C555-91) apresentou formação de biofilme intensa, além da presença do padrão AA em células epiteliais de bexiga humana (BOLL et al., 2013). Além desse relato, Herzog et al. (2014) descreveram um caso de ITU causado por EAEC em uma mulher imunocomprometida adulta, o qual evoluiu a um quadro de bacteremia e sepse. Assim, tais estudos indicam que fatores de virulência associados à EAEC podem aumentar a uropatogenicidade das cepas de *E. coli*, colocando o patotipo EAEC como um patógeno emergente de ITU e sepse.

A sintomatologia das infecções intestinais por EAEC inclui diarreia aquosa e ocasionalmente diarreia mucoide, náuseas, anorexia, febre baixa, ruídos intestinais e tenesmo (OKHUYSEN et al., 2004). Casos crônicos da infecção por EAEC podem levar à desnutrição, além do crescimento debilitado e comprometimento cognitivo em crianças que vivem em países em desenvolvimento (GUERRANT et al., 2008; LIMA et al., 2018; STEINER et al., 1998).

Na tentativa de identificar isolados patogênicos de EAEC, foram realizados estudos clínicos com voluntários adultos que receberam inóculos por via oral de cepas de EAEC isoladas de casos de diarreia (GOMEZ et al., 1995; MATHEWSON et al., 1986; NATARO et al., 1995). Em um desses estudos, quatro cepas de EAEC (17-2, 042, JM221 e 34b) foram administradas aos grupos de voluntários, mas apenas os que receberam a cepa 042 apresentaram diarreia (NATARO et al., 1995). Portanto, a diversidade de sintomas clínicos na infecção por esse patotipo pode ser devido a diversos fatores, tais como à heterogeneidade dos isolados, à dose infecciosa e a fatores imunes e genéticos de susceptibilidade do hospedeiro (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Devido os resultados observados nesse estudo em

voluntários (NATARO et al., 1995), a cepa 042 (sorotipo O44:H18), isolada de um quadro de diarreia aguda de uma criança Peruana, passou a ser considerada protótipo nos estudos sobre patogenicidade de EAEC (NAVARRO-GARCÍA; ELIAS, 2011). Nesse sentido, essa cepa foi amplamente caracterizada fenotípica e genotipicamente, o que permitiu a identificação de diversos fatores de virulência desse patótipo (CHAUDHURI et al., 2010).

A patogênese da infecção por EAEC pode ser resumida em três principais estágios, considerando os dados compilados de estudos conduzidos em voluntários, modelos animais e células epiteliais (*in vitro* e *ex vivo*): (I) aderência à mucosa intestinal; (II) formação de biofilme abundante; e (III) indução de resposta inflamatória (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; NAVARRO-GARCÍA; ELIAS, 2011).

A adesão à mucosa intestinal é um passo essencial da colonização e patogênese de isolados EAEC (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996). Diversos estudos demonstraram que o padrão AA é associado principalmente à presença de adesinas de origem fimbrial (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014). Dentre essas, as mais estudadas são as fímbrias denominadas AAF, ou *aggregative adherence fimbriae* (BOISEN et al., 2020; HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; WEINTRAUB, 2007). As AAFs são classificadas em cinco variantes: AAF/I (NATARO et al., 1992), AAF/II (CZECZULIN et al., 1997), AAF/III (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUENEC, 2002), AAF/IV (BOISEN et al., 2008) e AAF/V (JØNSSON et al., 2015). Recentemente, um *pilus* tipo IV, denominado *aggregate-forming pili* (AFP), foi identificado como responsável pelo estabelecimento do padrão AA em uma cepa heteropatogênica EAEC/STEC do sorotipo O23:H8 (LANG et al., 2018).

Além da adesão, a formação do biofilme é um importante fator que contribui para a patogênese de cepas EAEC, permitindo a persistência da infecção bacteriana, a evasão do sistema imune local, além de tornar as cepas mais resistentes a agentes antimicrobianos (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014). Adicionalmente, ensaios para quantificar e detectar a formação de biofilme têm sido amplamente utilizados para a triagem de cepas EAEC patogênicas (BANGAR; MAMATHA, 2008; SHEIKH et al., 2001; WAKIMOTO et al., 2004). Em vários estudos, a expressão das diferentes AAFs tem se mostrado essencial para a formação de biofilme em cepas EAEC (BOISEN et al., 2008; BOLL et al., 2013; FARFAN; INMAN; NATARO, 2008; SHAMIR et al., 2010; SHEIKH et al., 2001). Outros fatores envolvidos na formação de biofilme incluem a proteína codificada pelo gene *shf*, que se mostrou importante para a produção de

biofilme na cepa protótipo EAEC 042 (FUJIYAMA et al., 2008). Os genes *yafK* e *fis* também são importantes para a formação de biofilme, provavelmente devido ao seu envolvimento na regulação da expressão das AAFs (SHEIKH et al., 2001). Além disso, algumas estruturas bacterianas também foram identificadas em EAEC mediando a formação de biofilme, tais como, curli, antígeno 43, *E. coli common pilus* (ECP) e fímbria tipo 1 (AVELINO et al., 2010; DE LUNA et al., 2008; MOREIRA et al., 2003; RICHTER et al., 2014; SCHIEBEL et al., 2017; SHEIKH et al., 2001).

Uma vez aderidas ao epitélio intestinal, cepas de EAEC secretam diversas proteínas com atividades entero ou citotóxicas, que ocasionam danos na mucosa, desequilíbrio hidroeletrólítico e resposta inflamatória. Dentre essas diversas proteínas, as mais estudadas são EAST-1, Pic e Pet (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; NAVARRO-GARCÍA; ELIAS, 2011).

A toxina EAST-1 (*EAEC heat-stable enterotoxin 1*) foi primeiramente descrita por Savarino et al. (1991) na cepa EAEC 17-2. Essa toxina é codificada pelo gene *astA* e está associada ao aumento da secreção de cloro, por meio do aumento intracelular de GMP cíclico, o qual leva a quadros de diarreia aquosa (MÉNARD; DUBREUIL, 2002). Entretanto, o papel de EAST-1 na patogênese da diarreia por EAEC tem sido questionado devido a presença do gene *astA* em cepas de *E. coli* comensais (PAIXÃO et al., 2016; RÜTTLER et al., 2006; SAVARINO et al., 1996; VILA et al., 2000), além da ausência de diarreia em voluntários desafiados com cepas de EAEC produtoras de EAST-1 (NATARO et al., 1995).

A mucinase *protein involved in colonization* (Pic), é uma serinoprotease inicialmente descrita nas cepas bacterianas *Shigella flexneri* 2a e EAEC 042 (HENDERSON et al., 1999a). Essa serinoprotease apresenta atividade mucinolítica, e como secretagogo, induzindo a secreção de muco pelas células caliciformes intestinais (HARRINGTON et al., 2009; HENDERSON et al., 1999a; NAVARRO-GARCÍA et al., 2010). Outros papéis biológicos associados a Pic incluem a degradação do fator de coagulação V, clivagem de proteínas do sistema complemento e de glicoproteínas de superfície de leucócitos, além de induzir a hemaglutinação (ABREU et al., 2015; DUTTA et al., 2002; HENDERSON et al., 1999a; RUIZ-PEREZ et al., 2011). Ademais, Pic também está envolvida na colonização intestinal em modelos animais de camundongos e coelhos, onde devido a sua atividade mucinolítica, leva a clivagem do muco presente na luz intestinal, facilitando os

processos bacterianos de adesão e formação de biofilme nos enterócitos (HARRINGTON et al., 2009; MUNERA et al., 2014).

Outra serinoprotease de EAEC bastante estudada é a toxina *plasmid encoded toxin* (Pet), inicialmente descrita na cepa protótipo de EAEC 042 (ESLAVA et al., 1998). Foi demonstrado que quando injetado nas alças ileais de ratos, Pet provocou acúmulo de líquido e teve efeitos citotóxicos na mucosa (HENDERSON et al., 1999b). Em um modelo *ex vivo*, Pet causou aumentos na corrente de curto-circuito e diminuição da resistência elétrica nas células de jejuno de rato, um efeito enterotóxico que é acompanhado por dano à mucosa, aumento da liberação de muco, esfoliação de células e desenvolvimento de abscessos em cripta (NAVARRO-GARCÍA et al., 1998). Ao usar células epiteliais cultivadas para compreender o modo de ação dessa toxina, demonstrou-se que Pet é internalizada pelas células eucarióticas por meio de vesículas revestidas com clatrina, onde atinge o complexo de Golgi e, em seguida, o retículo endoplasmático rugoso (NAVARRO-GARCÍA et al., 2001). Por meio do processo de clivagem, Pet interrompe a atividade das proteínas intracelulares fodrina e espectrina, levando a uma perda das fibras de actina, contração do citoesqueleto e, finalmente, arredondamento e descolamento celular (NAVARRO-GARCÍA et al., 1999; NAVARRO-GARCÍA et al., 2007a, 2007b; NAVARRO-GARCÍA; ELIAS, 2011).

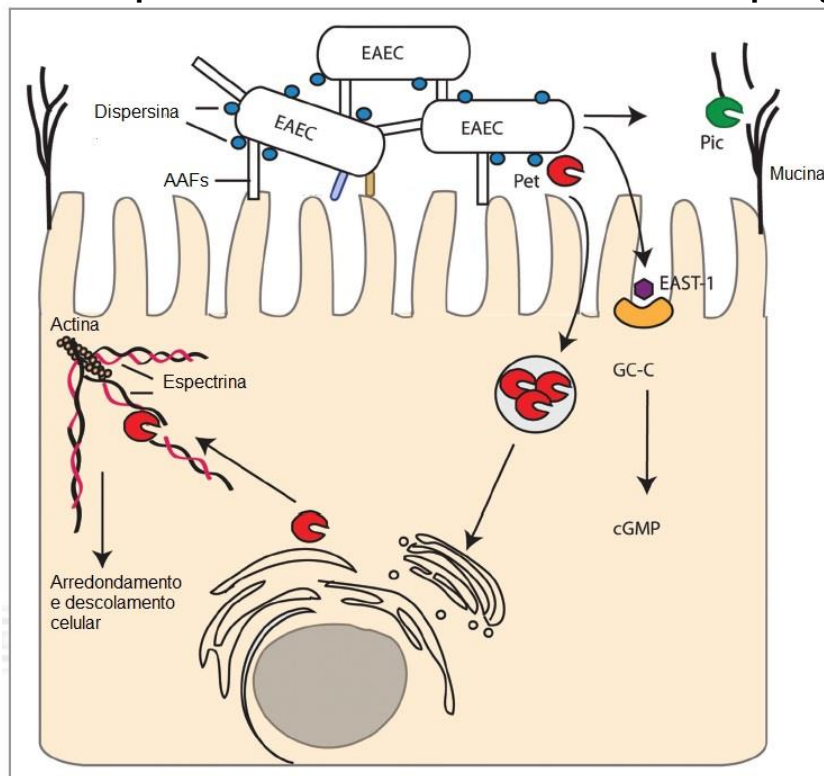
Outros fatores também contribuem para a patogênese das cepas EAEC, dentre eles a proteína anti-agregativa denominada dispersina, codificada pelo gene *aap* (*anti-aggregation protein*). A dispersina tem por função diminuir a autoagregação, o que permite a dispersão bacteriana ao longo do epitélio intestinal (SHEIKH et al., 2002). A secreção da dispersina para fora da célula bacteriana ocorre via sistema *ATP-binding cassette* (ABC), codificada por um *cluster* de cinco genes *aatPABCD* (*anti-aggregation protein transporter*) (NISHI et al., 2003). O gene *aatA* ainda é um dos alvos mais utilizados na identificação de EAEC e corresponde à primeira sonda genética para EAEC denominada sonda CVD432 ou sonda AA, (BAUDRY et al., 1990; LOZER et al., 2013).

A última etapa da patogênese da diarreia causada por EAEC corresponde à indução de resposta inflamatória em decorrência da adesão, formação de biofilme e secreção de diversas proteínas/toxinas. A resposta inflamatória frente à infecção por EAEC foi evidenciada pela detecção de níveis aumentados de lactoferrina fecal, IL-1 β e IL-8 (SANCHEZ-VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015). Com relação à IL-8, a indução de secreção foi associada à presença da flagelina H18 e da fímbria AAF/II da

cepa 042 (HARRINGTON et al., 2005; STEINER et al., 1998, 2000). Esses não são os únicos fatores indutores de resposta inflamatória na infecção intestinal por EAEC, o que inclui proteínas secretadas, como a serinoprotease SepA (ANDRADE, 2019; SANCHEZ-VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015).

Resumidamente, a **Figura 2** apresenta de forma esquemática o papel dos principais fatores de virulência associados a patogênese do patotipo EAEC.

Figura 2 - Principais fatores de virulência envolvidos na patogênese de EAEC



Adaptado de: Clements et al. (2012).

As cepas EAEC se ligam às células hospedeiras e umas às outras produzindo o padrão AA, o qual é mediado pelas fímbrias AAFs, mantidas de forma não colabada na superfície da célula bacteriana pela ação da dispersina. Dentre as proteínas liberadas ao interior celular tem-se Pic, que induz a produção/degradação da mucina e Pet, que cliva a fodrina e espectrina, interferindo com o citoesqueleto celular. A toxina EAST-1 se liga e ativa a guanilato ciclase (GC-C), resultando em aumento de GMP cíclico (cGMP).

A proteína AggR, codificada pelo gene *aggR* (*aggregative adherence regulator*), é uma proteína da família AraC que atua como reguladora global de virulência de EAEC, ativando a expressão de vários genes que codificam fatores de virulência plasmidiais, incluindo as AAFs, Pet, EAST-1, dispersina e seu sistema de transporte; além de genes cromossômicos, incluindo a ilha de patogenicidade cromossomal inserida em *pheU*, denominada de AAI (*aggR-activated island*), a qual

codifica um sistema de secreção do tipo VI (SST6) (DUDLEY et al., 2006; MORIN et al., 2013).

Considerando a importância do regulador transcricional AggR na patogênese de cepas EAEC, Kaper; Nataro e Mobley (2004) sugeriram o termo EAEC típica para cepas que apresentam o gene *aggR* e EAEC atípica para as cepas que não albergam este gene. As EAEC típicas compreendem um grupo de cepas potencialmente patogênicas, que têm sido associadas a casos de diarreia em todo o mundo (HARADA et al., 2007; SCAVIA et al., 2008). Inicialmente, acreditava-se que surtos de diarreia estariam mais relacionados a cepas EAEC típicas, mas alguns trabalhos relataram surtos ocasionados por cepas de EAEC atípicas, sendo que em um deles houve o acometimento de mais de mais de 2.000 pessoas (COBELJIC et al., 1996; ITOH et al., 1997; SCAVIA et al., 2008), demonstrando assim, o potencial patogênico dessas cepas.

Com relação ao diagnóstico, a observação do padrão AA no teste de adesão em culturas de células epiteliais tem sido considerado o método ouro para a identificação de cepas desse patotipo (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; NATARO et al., 1987; NAVARRO-GARCÍA; ELIAS, 2011). Porém, nos últimos anos, diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos como alternativa ao ensaio de adesão, pois são considerados menos laboriosos e mais objetivos na detecção de cepas EAEC (ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014; JENKINS et al., 2007; MOON; PARK; KIM, 2005).

Devido à grande heterogeneidade das cepas EAEC, considerando a frequência e combinações de marcadores de virulência, sabe-se que a virulência desse patotipo resulta da combinação de vários marcadores moleculares, por consequência, múltiplos genes vêm sendo utilizados para a detecção e caracterização de cepas EAEC (ELIAS et al., 2002; HUANG; JIANG; DUPONT, 2003; TOKUDA et al., 2010). Os genes *aggR* e *aatA*, presentes no plasmídio pAA da cepa protótipo EAEC 042 (CHAUDHURI et al., 2010), são bastante utilizados no diagnóstico molecular de EAEC (ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014; BUERIS et al., 2007). Além disso, alguns estudos vêm empregando os genes *aaiA*, *aaiC* ou *aaiG* (componentes do *operon aaiA-aaiP*) como marcadores cromossômicos adicionais para melhorar a eficiência do diagnóstico de EAEC (ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014; LIMA et al., 2013). Embora múltiplos marcadores de virulência estejam associados à patogenicidade de EAEC, genes como *aap*, *astA*, *pet* e *pic* foram abolidos no

diagnóstico de cepas EAEC considerando que a frequência dos mesmos é bastante variável (ABREU et al., 2013; FREIRE et al., 2020; MÉNARD; DUBREUIL, 2002; MONTEIRO et al., 2009; RUIZ et al., 2014).

Recentemente, Boisen et al. (2020) realizaram um estudo com o intuito de melhorar a definição desse patótipo, analisando o genoma de 97 cepas de EAEC isoladas de um grande estudo multicêntrico caso-controle de diarreia (KOTLOFF et al., 2013). Nesse estudo, os autores sugeriram que uma definição molecular mais específica de EAEC deveria compreender apenas as cepas de *E. coli* que albergam o gene *aggR* e os genes relacionados à biogênese de uma das adesinas AAF (I-V) ou o *cluster* gênico que codifica o fator de colonização CS22. Embora essa proposta de classificação pareça ser bastante específica e não seja baseada apenas na observação do padrão AA em culturas de células, o que já foi observado em cepas de STEC e EPEC atípicas (LASCOWSKI et al., 2013; MARTINS et al., 2015; MARTINS et al., 2016; SCHUROFF et al., 2014; VIEIRA et al., 2019), muitas questões sobre a melhor definição para cepas EAEC ainda permanecem em aberto, como por exemplo a exclusão por esta nova proposta das cepas descritas como EAEC atípicas (*aggR*), associadas a casos de diarreia em diversos estudos epidemiológicos (HUANG et al., 2007; HUANG; JIANG; DUPONT, 2003; OPINTAN et al., 2010; SPANO et al., 2017) e como agentes de surtos de diarreia (COBELJIC et al., 1996; ITOH et al., 1997).

1.3 *E. coli* uropatogênica (UPEC)

A ITU é a forma mais comum de infecção extraintestinal causada por *E. coli*, sendo essa bactéria também seu principal agente (TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017). As cepas de *E. coli* recuperadas de pacientes com ITU são denominadas UPEC, e tais cepas têm sido amplamente isoladas em pacientes de todo o mundo (ABE et al., 2008; MOUCHLI; SHAKHATREH; YEATON, 2019; SHAH et al., 2019). A grande maioria das ITUs (80 a 90%) são ocasionadas por UPEC, que podem ser residentes do trato intestinal e sob condições específicas ascender à bexiga pela uretra (FOXMAN, 2010; FLORES-MIRELES et al., 2015).

As ITUs são altamente prevalentes em mulheres, crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos (FOXMAN, 2002), e podem ser classificadas de acordo com a gravidade dos sinais e dos sintomas clínicos, na qual podem variar desde indivíduos assintomáticos até casos de cistites (dor supra-púbica e disúria, resultantes da

infecção restrita à bexiga) e pielonefrites (dor e febre resultantes de infecção renal) (FOXMAN; BROWN, 2003).

Para causar doença, as UPEC devem alcançar o trato urinário e apresentar uma combinação de genes que codificam adesinas fimbriais e/ou afimbriais, sistemas de aquisição de ferro, toxinas e mecanismos de escape do sistema imune (**Figura 3**). Tais marcadores de virulência, em conjunto, facilitam a colonização e invasão do hospedeiro, escape dos seus mecanismos de defesa, ocorrência de danos teciduais e estímulo a uma resposta inflamatória (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; HANNAN et al., 2012; TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017).

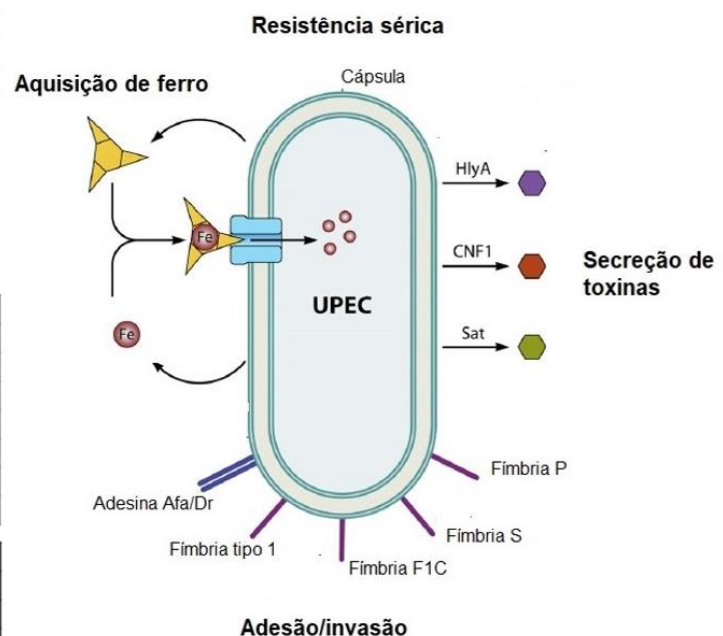
Figura 3 – Principais fatores de virulência associados a UPEC

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

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

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

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



Adaptado de Barber et al. (2016); Dale e Woodford (2015); Silva (2019).

A aderência a células uroepiteliais é especialmente importante para a patogênese das UPEC, uma vez que a consequente colonização tecidual contribui para que essas bactérias resistam ao fluxo urinário e ao muco, processos que tendem a removê-las do trato (FORSYTH et al., 2018). Adicionalmente, a multiplicidade de

adesinas necessárias para o reconhecimento de vários receptores ao longo do trato urinário é um importante fator no desenvolvimento das infecções causadas por UPEC, podendo auxiliar no aumento de sua virulência (LÜTHJE; BRAUNER, 2014; ZAMANI; SALEHZADEH, 2018).

A fímbria P (Pap, *pyelonephritis-associated pilus*) é uma das adesinas presentes em cepas de UPEC e sua denominação deriva da sua capacidade em aderir ao antígeno do grupo sanguíneo P (KÄLLENIUS et al., 1980). Essa fímbria consiste em uma família de organelas adesivas que reconhecem diferentes regiões do antígeno P sanguíneo, sendo PapG a proteína que de fato se liga ao receptor específico desse antígeno (HULTGREN et al., 1989). Cepas UPEC podem possuir um ou mais *operons* de fímbria P, sendo que esses *operons* podem codificar variantes sorológicas distintas da subunidade estrutural (PapA) e/ou pequenas diferenças na especificidade de ligação de PapG (JOHNSON, 1991).

Uma segunda família de adesinas altamente homólogas descritas em cepas de UPEC compreende a família da fímbria S (*Sfa*, *S fimbrial adhesin*), codificada pelo *operon sfa*, e a fímbria F1C, codificada pelo *operon foc* (OTT et al., 1988). Embora tais adesinas sejam geneticamente relacionadas, e suas sequências nucleotídicas apresentem alta homologia (SCHMOLL et al., 1990), elas diferem em relação à especificidade a receptores celulares. A fímbria F1C se liga a receptores contendo galactosilceramida, expressos por células epiteliais ao longo do trato urinário (BÄCKHED et al., 2002; KHAN et al., 2000); enquanto a fímbria S se liga a receptores contendo α -sialil-2-3- β -galactose, presentes nos eritrócitos e em células epiteliais tubulares renais (KORHONEN et al., 1986; KREFT et al., 1995; PARKKINEN et al., 1986).

A fímbria curli pertence à classe das proteínas amiloides, sendo composta pela subunidade principal CsgA, que após o transporte para a superfície bacteriana precipita com a ajuda da subunidade CsgB, formando a fímbria funcional (BARNHART; CHAPMAN, 2006). Juntamente com a celulose, a fímbria curli representa um dos principais componentes do biofilme em *E. coli* e outras bactérias da família Enterobacteriaceae (RÖMLING, 2005) e são frequentemente expressas por isolados patogênicos e comensais (KAI-LARSEN et al., 2010; NORINDER et al., 2012).

A expressão do curli é ativada pela limitação de nutrientes e sais, tensão reduzida de oxigênio e temperatura abaixo de 30 °C (GERSTEL; RÖMLING, 2001;

OLSÉN et al., 1993; RÖMLING et al., 1998). No entanto, muitas cepas patogênicas também podem expressar curli a 37 °C *in vitro* (KUDINHA et al., 2013; LIM; PINKNER; CEGELSKI, 2014; RAMOS et al., 2011) e durante a infecção em humanos (BIAN et al., 2000; KAI-LARSEN et al., 2010). Portanto, essas observações indicam que, além de apoiar a sobrevivência bacteriana fora do hospedeiro, curli é um importante fator de virulência. Adicionalmente, a fímbria curli interage especificamente com proteínas do hospedeiro para iniciar a adesão, colonização e invasão nas células, além de induzir fortes respostas imunológicas (BARNHART; CHAPMAN, 2006; CORDEIRO et al., 2016; LÜTHJE; BRAUNER, 2014). Curli também interage com proteínas séricas do hospedeiro, o que pode promover a disseminação bacteriana e a entrada na corrente sanguínea (BARNHART; CHAPMAN, 2006). Nesse sentido, as cepas UPEC positivas ao curli são mais propensas a causar urosepse, ou seja, o quadro de sepse resultante de complicações da ITU (HUNG et al., 2014).

A fímbria ECP apresenta alta frequência em isolados de DEC e ExPEC, e os genes responsáveis por sua produção estão presentes em um *operon* composto pelos genes *ecpABCDEF* (GARNETT et al., 2012). Saldaña et al. (2014) relataram que cepas UPEC são capazes de produzir ECP sob diversas condições biológicas, além de destacar o seu papel como um fator de adesão acessório que em conjunto com outras adesinas pode contribuir para a interação de cepas UPEC com células uroepiteliais do hospedeiro.

A fímbria tipo 1, além de participar do estabelecimento do padrão AA em cepas EAEC (MOREIRA et al., 2003), também apresenta alta frequência em cepas comensais, DEC e ExPEC, bem como em diversas espécies da família Enterobacteriaceae (ABE et al., 2008; NORINDER et al., 2012; SARABI ASIABAR et al., 2018; SAROWSKA et al., 2019; STAHLHUT et al., 2009). Esta fímbria é capaz de aderir a uma variedade de células eucarióticas, sendo esta ligação inibida por manose, oligossacarídeos manosídicos α -ligados e certos análogos a manose (LE BOUGUÉNEC, 2005; OLD, 1972; SCHILLING; MULVEY; HULTGREN, 2001). Os genes envolvidos com a biogênese da fímbria tipo 1 estão organizados em um *operon* cromossômico, onde o produto do gene *fimH* (FimH) determina a ligação aos receptores celulares e a capacidade de se ligar a fibronectina (KROGFELT; BERGMANS; KLEMM, 1990; ORNDORFF; BLOCH, 1990).

A ligação de FimH aos seus receptores medeia a adesão, a invasão e promove a formação de comunidades bacterianas intracelulares, ou IBCs (*intracellular*

bacterial communities), refletindo a função crucial dessa fímbria na colonização bacteriana do trato urinário (ETO et al., 2007; WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007; ZHOU et al., 2001). As IBCs são colônias bacterianas que se multiplicam rapidamente dentro da célula hospedeira apresentando um aspecto semelhante a "vagens" salientes em direção ao lúmen da bexiga urinária (ANDERSON et al., 2003). As IBCs representam o estágio agudo da infecção e, eventualmente, as bactérias podem emergir dessas estruturas para colonizar novamente o urotélio e invadir novas células (JUSTICE et al., 2004).

Além das adesinas fimbriais, cepas UPEC também podem expressar uma variedade de adesinas afimbriais homólogas, compreendidas na família Dr de adesinas, a qual inclui a adesina Afa (*afimbrial adhesin*) (LE BOUGUÉNEC, 2005; NOWICKI et al., 1990). Estas adesinas apresentam considerável homologia na sequência de aminoácidos ou reagem cruzadamente com sequências de DNA de outros membros da família (SWANSON et al., 1991). Além do mais, compartilham o antígeno de grupo sanguíneo Dr como receptor, o qual consiste em uma glicoproteína de membrana que protege os tecidos do hospedeiro contra os danos resultantes da ativação do sistema complemento (NOWICKI et al., 1993).

As bactérias precisam ser equipadas com sistemas para sobreviver no trato urinário, uma vez que a disponibilidade de ferro nesse ambiente é extremamente limitada (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). A necessidade vital de aquisição de ferro para *E. coli* no trato urinário é ilustrada por uma forte regulação positiva de genes que codificam sistemas de aquisição de ferro durante a ITU (HAGAN et al., 2010; SNYDER et al., 2004). Devido ao fato da alta toxicidade e insolubilidade dos íons de ferro, as bactérias captam ferro usando proteínas do hospedeiro ligadas a estes íons ou ao grupamento heme (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). Os dois receptores de heme ChuA e Hma, encontrados em *E. coli*, fornecem significantes vantagens em modelos de coinfeção, especialmente na colonização dos rins (GARCIA; BRUMBAUGH; MOBLEY, 2011; HAGAN; MOBLEY, 2009).

As bactérias também produzem suas próprias proteínas complexadoras de ferro, conhecidas como sideróforos. Os sideróforos são moléculas quelantes de ferro secretadas, carregadas com ferro e absorvidas pela célula bacteriana por meio de receptores específicos na membrana externa (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011). Foram identificados em isolados de UPEC quatro sistemas de sideróforos comuns no

contexto de infecção: enterobactina, salmoquelina, aerobactina e yersiniabactina (LÜTHJE; BRAUNER, 2014).

A capacidade de cepas de *E. coli* em resistir ao efeito bactericida do sistema complemento pode aumentar seu potencial de virulência, conferindo a capacidade de colonizar diferentes locais anatômicos pela corrente sanguínea (DALE; WOODFORD, 2015; LÜTHJE; BRAUNER, 2014). Em cepas UPEC, as ITUs podem levar à infecção da corrente sanguínea e mecanismos que permitem que essas cepas resistam à atividade bactericida do soro humano são importantes mecanismos de virulência para o desenvolvimento da urosepse (COGGON et al., 2018). Vários fatores de virulência estão associados à resistência à ação bactericida do soro humano, tais como cápsulas e protectinas, codificados por diferentes genes, tais como *kpsMTII* (*group II capsule antigens*), *traT* (*transfer Protein*) e *iss* (*increased serum survival*) (DALE; WOODFORD, 2015).

Adicionalmente, cepas UPEC também podem produzir vários tipos de hemolisinas, como por exemplo a alfa-hemolisina, além de diversas bacteriocinas (DALE; WOODFORD, 2015). Nas infecções extraintestinais como as que ocorrem no trato urinário, as hemolisinas têm múltiplos efeitos e funções, incluindo resistência à defesa do hospedeiro, dano tecidual e letalidade por ação direta ou por estimulação de mediadores inflamatórios e vias de transdução de sinal, além de estarem diretamente relacionadas com a sepse fulminante em modelo animal (BHAKDI, MARTIN, 1991; ELLIOT et al., 1998; ERMERT et al., 1992; JOHNSON et al., 2019).

As bacteriocinas são toxinas que têm ação letal sobre espécies bacterianas sensíveis. As bacteriocinas produzidas pela *E. coli* são denominadas de colicinas e classificadas em 25 tipos, conforme o receptor celular no qual se liga (CASCALES et al., 2007). Embora colicinas estejam presentes em diversos patótipos de *E. coli*, além de cepas comensais (SMARDA; OBDRZÁLEK, 2001; RILEY; GORDON, 1992), alguns estudos indicaram que certas colicinas, como a colicina V e colicina E1, são comumente presentes em cepas ExPEC, mostrando que a sua produção pode estar associada à patogenicidade dessas cepas de *E. coli* (JOHNSON et al., 2005; SMAJS et al., 2010).

Assim, cepas UPEC representam um patótipo heterogêneo com uma ampla gama de fatores de virulência, onde diferentes genótipos têm sido utilizados para a identificação e classificação dessas cepas (JOHNSON; STELL, 2000; KHAIRY et al., 2019). De modo geral, para cepas ExPEC a classificação estabelecida por Johnson

et al. (2003) estabelece que a presença de dois ou mais genes entre *papA* e *papC* (fímbria P), *sfa/foc* (fímbria S/F1C), *afa/dra* (adesinas da família Dr), *iutA* (receptor de aerobactina) e *kpsMT II* (cápsula do grupo 2), indica que a cepa é capaz de causar doença em um indivíduo sadio. Mais recentemente, Spurbeck et al. (2012) propuseram que a presença obrigatória do gene *fyuA* (receptor sideróforo de yersiniabactina) juntamente com dois ou mais dos genes *yfcV* (fímbria Yfc), *chuA* (receptor heme) e *vat* (autotransportadora), torna muito mais provável que a cepa represente uma UPEC. Embora esses critérios sejam importantes na classificação de cepas extraintestinais, e mais especificamente de cepas UPEC, a presença de isolados de ITU negativos a esses critérios (FLAMENT-SIMON et al., 2020; SPURBECK et al., 2012) dificulta o estabelecimento de conjunto específico de genes virulência que possam utilizados para a classificação destas cepas.

1.4 Cepas de *E. coli* híbridas e heteropatogênicas

Nos últimos anos, a classificação de cepas de *E. coli* em patotipos ou grupos específicos têm sido amplamente utilizada. Comumente, cepas ExPEC são designadas pelo seu local de isolamento e agrupadas com base no hospedeiro susceptível e tipo de doença que causam, enquanto cepas de DEC são subdivididas em vários patotipos baseado na presença de marcadores de virulência específicos diretamente relacionados ao desenvolvimento da doença (GOMES et al., 2016; KÖHLER; DOBRINDT, 2011). Entretanto, esse cenário bem caracterizado e específico começou a ser contestado após um grande surto de diarreia e síndrome hemolítica urêmica ocorrido em vários países da Europa em 2011, na qual foi relatada a presença de uma cepa de *E. coli* com características típicas de EAEC e com a capacidade de produzir a toxina Stx de STEC (BIELASZEWSKA et al., 2011; BOISEN et al., 2014; NAVARRO-GARCÍA, 2014; SCHEUTZ et al., 2011).

Desde a ocorrência desse surto em 2011 e com o aumento do acesso ao sequenciamento do genoma completo, alguns estudos descrevem que a combinação de fatores de virulência específicos a diferentes patotipos em uma mesma cepa de *E. coli* é um fenômeno muito mais frequente do que se imaginava anteriormente (SANTOS et al., 2020). Esses dados destacam a plasticidade genômica das cepas de *E. coli* e mostram que fatores de virulência específicos podem estar distribuídos entre cepas de DEC e ExPEC. Concomitantemente, os termos “híbrida” e

“heteropatogênica” emergiram para designar um potencial mais virulento em cepas que apresentam uma combinação de fatores de virulência, anteriormente considerados específicos para cada grupo de *E. coli* (ANG et al., 2016; BIELASZEWSKA et al., 2014; LARA et al., 2017; TOVAL et al., 2014).

Para facilitar o entendimento e aplicação desses termos, Santos et al. (2020) propuseram definições mais específicas. Uma cepa heteropatogênica corresponde àquela que alberga genes de virulência que são característicos de dois ou mais patótipos de DEC. Portanto, os heteropatógenos são estritamente enteropatógenos, e sua definição é direta porque genes que delineiam cepas de DEC são bem definidos. Em contraste, uma cepa híbrida exibe fatores de virulência de DEC e ExPEC ou, alternativamente, são isoladas de uma infecção extraintestinal e codificam fatores de virulência específicos de DEC.

A primeira evidência de que algumas cepas de EAEC poderiam causar infecção extraintestinal ocorreu a partir de um surto comunitário de ITU na cidade de Copenhague, Dinamarca (OLESEN et al., 1994). Na caracterização genotípica e fenotípica das cepas relacionadas ao surto foi demonstrado que elas pertenciam ao sorotipo O78:H10, comumente associada à diarreia. Essas cepas abrigavam características de cepas EAEC, tais como a produção do padrão AA em células epiteliais cultivadas, genes de virulência associados a EAEC e pertenciam ao ST10 (OLESEN et al., 2012). Além disso, foram letais em modelo de sepse subcutânea de camundongo e, portanto, consideradas como ExPEC, claramente diferente de outras cepas de EAEC isoladas de diarreia (OLESEN et al., 2012).

Posteriormente, muitos estudos foram publicados registrando o isolamento de cepas de infecções extraintestinais com um perfil genotípico definidor de EAEC, além de expressarem o padrão AA *in vitro* (ABE et al., 2008; FLAMENT-SIMON et al., 2020; FREIRE et al., 2020; LARA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2021; NAZEMI et al., 2011; PARK et al., 2009; TOVAL et al., 2014). No entanto, a presença de marcadores de ExPEC são raros entre cepas EAEC isoladas de infecções extraintestinais (ABE et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2021; NUNES et al., 2017; TOVAL et al., 2014). Além disso, ainda não está claro se essas mesmas cepas podem causar infecções em determinados nichos intestinais e extraintestinais.

Por fim, o desafio atual em relação à classificação de cepas de *E. coli* em híbridas ou heteropatogênicas é entender se esses fatores de virulência estão de fato envolvidos no desenvolvimento da doença e se eles apresentam relevância clínica.

1.5 *E. coli* UPEC-46

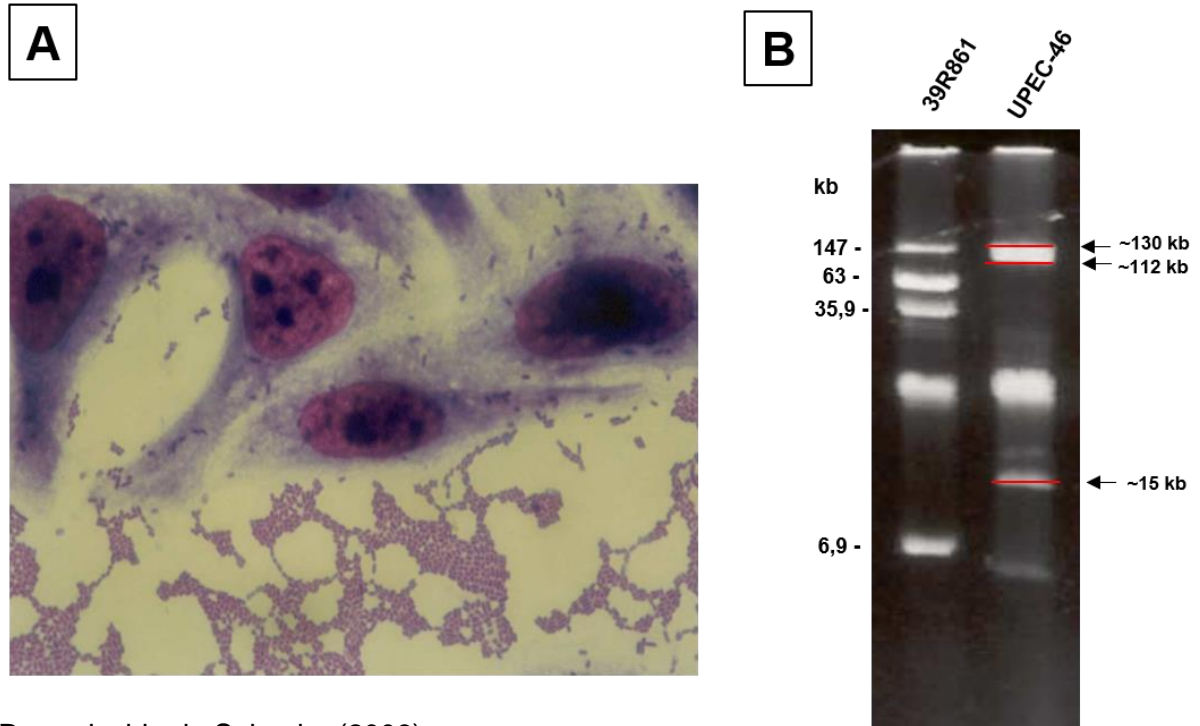
Considerando os aspectos analisados no tópico anterior, o grupo da Profa. Dra. Tânia A. T. Gomes (Disciplina de Microbiologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP), iniciou na década de 1990 um estudo sobre a caracterização de cepas de UPEC isoladas de pacientes com ITU sintomática, de diferentes faixas etárias e de ambos os sexos, buscando características fenotípicas e genotípicas de EAEC (FALSETTI, 1998). Esse estudo foi posteriormente ampliado para a pesquisa de marcadores de virulência de outros patótipos de DEC, tais como EPEC, DAEC e EHEC (ABE et al., 2008).

Dentro dessa linha de pesquisa, Falsetti (1998) analisou marcadores de EAEC em 226 cepas de UPEC, identificando 14 cepas produtoras do padrão AA em células HeLa. Cinco dessas cepas hibridizaram com a sequência correspondente ao fragmento sonda CVD432, ou sonda EAEC, e ao *operon* que codifica AAF/I. Além disso, quatro dessas cepas foram positivas para a fímbria P, adesina bem caracterizada em UPEC (FALSETTI, 1998). Posteriormente, foi selecionada uma cepa dentre essas 14, com o objetivo de estudar com maiores detalhes as estruturas envolvidas na aderência dessa cepa (SALVADOR, 2006).

Dentre as 14 cepas, quatro foram descartadas pelo fato de produzirem destacamento celular no período de 3 h do ensaio de adesão, devido à produção de alfa-hemolisina (ABE et al., 2008; FALSETTI, 1998; SALVADOR, 2006). Das outras 10 cepas, apenas três foram negativas para a presença de genes associados a adesinas de DEC ou ExPEC e, dentre essas, apenas uma foi positiva para a presença de marcadores de virulência associados a EAEC (SALVADOR, 2006). Logo, analisando-se o conjunto de dados obtidos, elegeu-se a cepa UPEC-46 (sorogrupo O166), devido a diversidade de marcadores do patótipo EAEC (*aatA*, *aap*, *astA*, *pet* e *irp2*) e a ausência de sequências genéticas de adesinas relacionadas ao padrão AA (SALVADOR, 2006).

Inicialmente, o estudo mostrou que a cepa UPEC-46 apresentava resistência à tetraciclina e ao sulfazotrim, expressava a fímbria tipo 1 e produzia o padrão AA em células HeLa no ensaio de 6 h (**Figura 4A**). A análise do perfil plasmidial indicou a presença de pelo menos três plasmídios, sendo dois de alto peso molecular (~130 kb e ~112 kb) e um de baixo peso molecular (~15 kb) (**Figura 4B**) (SALVADOR, 2006).

Figura 4 – Padrão de adesão e perfil plasmidial da cepa UPEC-46



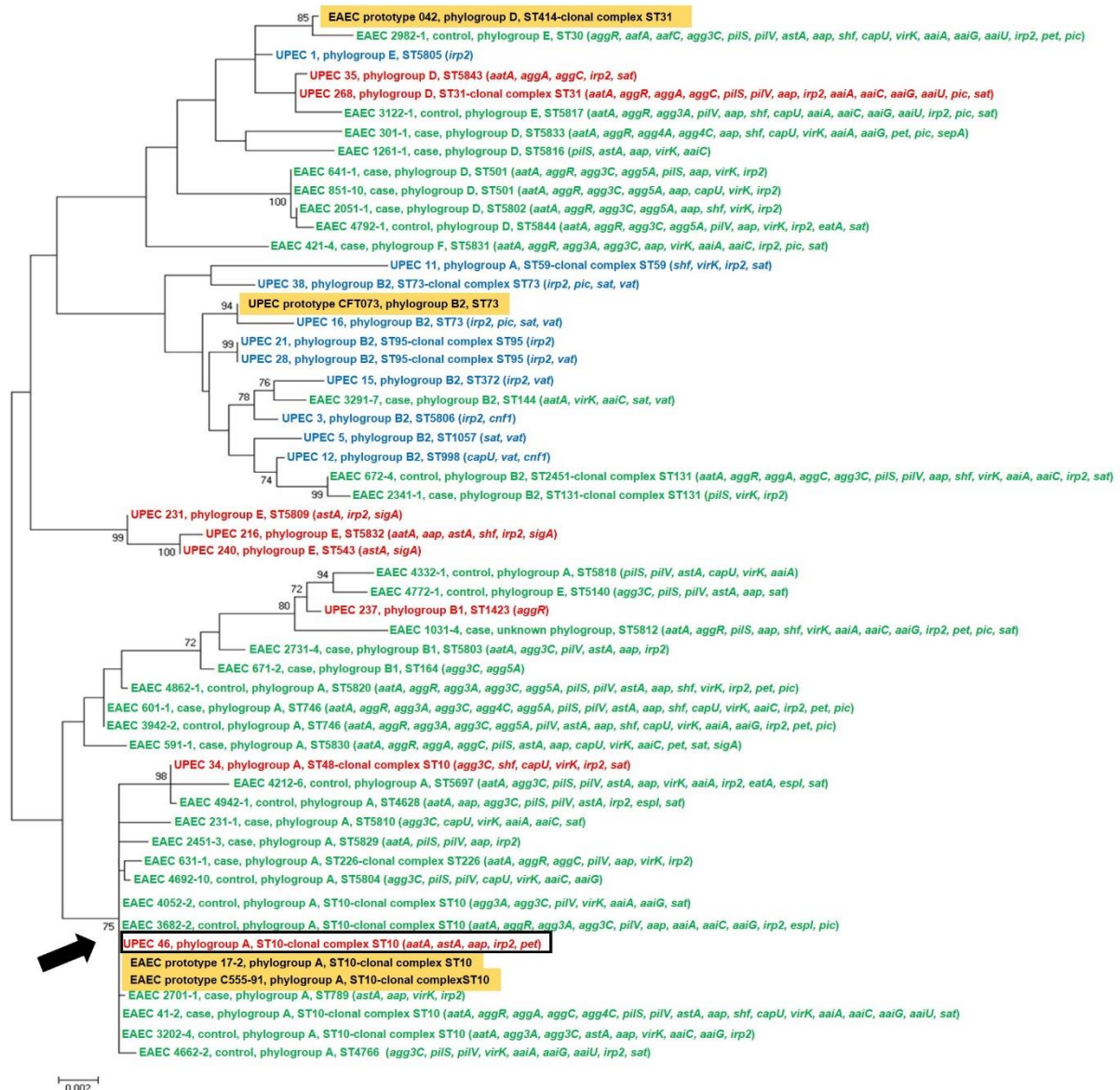
Reproduzido de Salvador (2006).

(A) Padrão de aderência agregativa apresentado pela cepa UPEC-46 em células HeLa após 6 h de interação a 37 °C, na presença de 2% de D-manose. Pode-se observar a presença de bactérias formando agregados aderidos na superfície da lamínula. A lamínula foi corada com May-Grünwald/Giemsa e observada em microscópio óptico comum. Aumento: 1.000 X. **(B)** Análise eletroforética do perfil plasmidial das cepas UPEC-46 e *E. coli* R861 (padrão de tamanho molecular plasmidial) em gel de agarose (0,7%). Estimativas de tamanhos moleculares em kb.

Posteriormente, os plasmídios da cepa UPEC-46 foram analisados quanto ao seu papel na resistência a antibióticos e no estabelecimento do padrão AA por meio de ensaios de conjugação. Os transconjugantes obtidos receberam apenas a banda de ~112 kb, ou essa banda em conjunto à banda de ~15 kb, sugerindo que os genes de resistência à tetraciclina e ao sulfazotrim estavam contidos no plasmídio de ~112 kb, o qual, no entanto, não estava relacionado ao estabelecimento do padrão AA (SALVADOR, 2006). Adicionalmente, uma biblioteca genômica foi construída na tentativa de identificar a adesina responsável pelo padrão AA na cepa UPEC-46. Embora, essa adesina não tenha sido totalmente caracterizada, Salvador (2006) demonstrou que seus determinantes genéticos devem estar localizados no plasmídio não conjugativo (~130 kb) ou no cromossomo. Além disso, os genes que codificam a dispersina (*aap*) e a seu transportador ABC (*aat*) não seriam essenciais para o estabelecimento desse fenótipo.

Recentemente, nosso grupo realizou um estudo pesquisando a presença de marcadores de ExPEC em cepas de EAEC isoladas de fezes de casos de diarreia e controles assintomáticos (NUNES et al., 2017). O objetivo desse estudo foi analisar as relações filogenéticas entre cepas de EAEC que apresentavam marcadores genéticos de ExPEC e cepas de UPEC com e sem marcadores genéticos de EAEC através da geração de um filograma com os dados das sequências dos genes *housekeeping* do MLST, conforme apresentado na **Figura 5**.

Figura 5 – Filograma e características genéticas de cepas EAEC e UPEC



Adaptado de Nunes et al. (2017).

Filograma construído por meio do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. Em preto e destacado em amarelo estão representadas as cepas protótipos; em verde as cepas EAEC classificadas como ExPEC pelo critério de Johnson et al. (2003); em azul as cepas UPEC sem a presença de marcadores de EAEC e em vermelho as cepas UPEC com marcadores de EAEC. A seta preta evidencia o *cluster* relacionado às cepas protótipos EAEC C555-91 e 17-2. A cepa UPEC-46 está destacada pela barra preta.

Conforme evidenciado pela seta no filograma, é interessante notar que este último grupamento onde a cepa UPEC-46 está presente foi constituído por cepas do filogruppo A e, em sua maioria, por cepas fecais isoladas de casos de diarreia e controles saudáveis, na qual a maioria pertenciam ao ST10. Juntamente com a cepa UPEC-46 estavam presentes as cepas EAEC 17-2 e C555-91. A cepa 17-2 (sorotipo O3:H2) é cepa protótipo da fímbria AAF/I, isolada de um caso de diarreia infantil

(NATARO et al., 1992), enquanto a cepa C555-91 (sorotipo O78:H10) é a cepa protótipo que causou um surto de ITU na Dinamarca (OLENSEN et al., 2012). Por fim, de acordo com Nunes et al (2017), a cepa UPEC-46 foi negativa para os genes de virulência usados para avaliar o potencial extraintestinal em cepas de *E. coli*: *papA* e *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* e *kpsMT II* (JOHNSON et al., 2003).

Tendo por base as características descritas anteriormente acerca da cepa UPEC-46, aliado ao desconhecimento da adesina que medeia a aderência agregativa dessa cepa, o presente estudo teve como foco uma análise mais detalhada das características genóticas e fenóticas dessa cepa, e conseqüentemente, a caracterização das adesinas envolvidas no fenótipo AA, com o intuito de uma melhor compreensão do seu potencial patogênico.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Identificar as adesinas que medeiam a aderência agregativa na cepa UPEC-46 e determinar o papel delas na patogênese da infecção urinária e colonização intestinal.

2.2 Específicos

- I. Caracterizar fenotípica e genotipicamente a cepa UPEC-46;
- II. Identificar as adesinas que medeiam o padrão AA nessa cepa;
- III. Verificar o papel *in vitro* dessas adesinas na adesão e invasão nas linhagens celulares HeLa, HT-29 e 5637;
- IV. Analisar a contribuição dessas adesinas na colonização intestinal e na uropatogênese utilizando modelos murinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental do presente estudo pode ser resumido nas diversas etapas descritas a seguir:

a) caracterização fenotípica da cepa UPEC-46. Nesta etapa, a UPEC-46 foi analisada quanto a diferentes características fenotípicas, tais como a capacidade de aderir e invadir células epiteliais em cultura, de formar biofilme, de resistir à atividade bactericida do soro, de produzir a toxina Pet, bacteriocinas, hemolisinas, fímbria curli e celulose.

b) caracterização genotípica da cepa UPEC-46. O genoma completo da UPEC-46 foi sequenciado, montado e anotado. Além disso, outras análises *in silico* foram realizadas, incluindo análises filogenéticas comparando a UPEC-46 com outras cepas de *E. coli* de referência e do ST10.

c) caracterização *in silico* da fímbria *aggregate forming pilus* (AFP). A adesina AFP foi identificada em outras linhagens de *E. coli* e os principais fatores de virulência associados a DEC e ExPEC foram identificados e comparados nessas cepas. Além disso, a identidade nucleotídica e de aminoácidos dos genes do *operon afp* e do regulador *afpR* nas cepas de *E. coli* AFP positivas foi comparado com a cepa UPEC-46.

d) análise do papel de AFP na adesão da cepa UPEC-46. Foram construídas cepas mutante e mutante complementada no gene *afpA* para avaliar o papel de AFP no estabelecimento do padrão AA.

e) análise ultraestrutural de AFP. Um soro policlonal anti-UPEC-46, adsorvido com a cepa mutante em *afpA*, foi produzido em coelho e utilizado em *immunoblotting* e microscopia eletrônica de transmissão com imunomarcação para visualização da de AFP nas diferentes cepas analisadas.

f) identificação de outras adesinas presentes na UPEC-46 responsáveis pelo padrão AA. Essa etapa foi realizada por meio da construção de uma biblioteca de mutantes, empregando para isso o *transposon EZ-Tn5*. Mutantes negativos ao fenótipo AA foram identificados e o local de inserção do *transposon* sequenciado. Os mutantes selecionados foram caracterizados com base em ensaios fenotípicos, tais como curva de crescimento, motilidade e expressão da fímbria tipo 1. Após a identificação das adesinas, as cepas mutantes e complementadas foram obtidas e caracterizadas por ensaios fenotípicos (curva de crescimento, motilidade, expressão

da fímbria tipo 1, ensaios qualitativos e quantitativos de aderência e invasão em diferentes linhagens de células epiteliais.

g) análises *in vivo* das cepas mutantes e complementadas. Nessa etapa foi verificado o papel das adesinas associadas no estabelecimento da adesão agregativa na colonização de órgãos do trato urinário (bexiga e rins) e na colonização intestinal, utilizando para isso diferentes modelos murinos estabelecidos.

3.1 Cepas bacterianas e plasmídios

A cepa de *E. coli* utilizada nesse estudo (UPEC-46) foi obtida de um paciente apresentando infecção urinária sintomática laboratorialmente confirmada (número de unidade formadora de colônia [UFC] superior a 100.000 por mililitro de urina), atendido no Hospital São Paulo (Escola Paulista de Medicina, UNIFESP), na cidade de São Paulo, Brasil. Essa cepa foi isolada e identificada no Serviço de Microbiologia no Laboratório Central do Hospital São Paulo (FALSETTI, 1998). Devido ao modelo das fichas para requisição de exames no hospital, na ocasião da coleta, não foi possível identificar importantes informações do paciente, tais como sexo, faixa etária ou se apresentava sintomas de cistite ou pielonefrite.

As diferentes cepas bacterianas e os plasmídios utilizados neste estudo estão listados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Características das cepas bacterianas e plasmídios utilizados neste estudo

Cepas/plasmídios	Características	Referência/fonte
Cepas		
UPEC-46	Cepa de <i>E. coli</i> selvagem, sorogrupo O166	Falsetti (1998)
UPEC-46:: <i>afpA</i>	Cepa UPEC-46 carreando o vetor pJP5603 integrado ao gene <i>afpA</i>	Esse estudo
UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3)	Cepa UPEC-46 carreando o vetor pJP5603 integrado ao gene <i>afpA</i> , complementada com o plasmídio pPAS3	Esse estudo
UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i>	Cepa UPEC-46 com mutações nos genes <i>afpA</i> (pela inserção do vetor pJP5603) e <i>fimH</i> (pelo sistema <i>lambda-Red</i>)	Esse estudo
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> K-12, utilizada para propagação plasmidial e controle negativo para adesão, formação de biofilme, expressão de curli e celulose, resistência ao soro, produção de hemolisinas e bacteriocinas	Stratagene, EUA
<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir)	<i>E. coli</i> K-12 lisogenizada com o fago lambda e albergando o gene <i>pir</i>	Elliott; Kaper (1997)
<i>E. coli</i> S17-1(λ pir)	Cepa conjugativa de <i>E. coli</i> K-12 lisogenizada com o fago lambda e albergando o gene <i>pir</i>	Simon; Priefer; Pühler (1983)
<i>E. coli</i> DH5 α (pPAS1)	Cepa DH5 α carreando o plasmídio pPAS1	Esse estudo
<i>E. coli</i> S17-1(λ pir) (pPAS2)	Cepa S17-1(λ pir) carreando o plasmídio pPAS2	Esse estudo
<i>E. coli</i> DH5 α (pPAS3)	Cepa DH5 α carreando o plasmídio pPAS3	Esse estudo
<i>E. coli</i> 042	Cepa EAEC (O44:H18), controle positivo de produção de Pet, formação de biofilme e adesão agregativa	Nataro et al. (1987)
<i>E. coli</i> BA320	Cepa EPEC atípica (O55:H7), controle positivo para a expressão de celulose	Bueris et al. (2007)
<i>E. coli</i> BA732	Cepa EAEC (O17:H18), controle negativo para a expressão de Pet	Bueris et al. (2007)
<i>E. coli</i> C600	Cepa de <i>E. coli</i> K-12 utilizada como indicadora para a produção de bacteriocinas e como controle negativo ao teste de invasão	Appleyard (1954)
<i>E. coli</i> E2348/69	Cepa EPEC típica (O127:H6), controle positivo para a expressão de curli	Levine et al. (1978)
<i>E. coli</i> J96	Cepa UPEC (O4:K6), controle positivo para a expressão de α -hemolisina	Hull et al. (1981)
<i>E. coli</i> 17-2	Cepa EAEC (O3:H2), controle positivo para a expressão da fímbria tipo 1	Nataro et al., 1992
<i>E. coli</i> HB101	<i>E. coli</i> K-12, controle negativo nas PCRs e para expressão da fímbria tipo 1	Sambrock; Fritsch; Maniatis (1989)
<i>Shigella flexneri</i> 2a	<i>Shigella flexneri</i> , controle negativo para o teste de motilidade e controle positivo para o teste de invasão	Bârzu et al. (1997)

(continua)

(conclusão)

Cepas/plasmídios	Características	Referência/fonte
Plasmídios		
pGEM-T <i>Easy</i>	Vetor de clonagem (3.015 pb)	Promega, EUA
pJP5603	Vetor suicida para mutagênese por recombinação homóloga	Penfold; Pemerton (1992)
pKOBEG- <i>Apra</i>	Plasmídio que expressa as recombinases do fago λ <i>Red</i> e contém o gene que codifica resistência à apramicina	Sampaio et al. (2009)
pKD3	Plasmídio contendo gene de resistencia ao cloranfenicol	Datsenko; Wanner (2000)
pACYC177	Vetor de expressão de baixo número de cópias (3.941 pb)	Chang et al. (1978)
pPAS1	Fragmento de 307 pb do gene <i>afpA</i> amplificado por PCR e clonado no vetor pGEM-T <i>Easy</i>	Esse estudo
pPAS2	Fragmento de 307 pb do gene <i>afpA</i> subclonado do plasmídio pPAS1 após digestão com a enzima EcoRI, clonado no vetor pJP5603 no sítio de restrição de EcoRI	Esse estudo
pPAS3	Gene <i>afpA</i> completo (615 pb) amplificado por PCR com os sítios de restrição de XhoI e HindIII e clonado nos correspondentes sítios de restrição do vetor pACYC177	Esse estudo

3.2 Condições de cultivo e manutenção das cepas bacterianas

Todas as cepas foram cultivadas a 37 °C em caldo Luria-Bertani (LB; Kasvi, Brasil), ágar LB (LBA; Kasvi) ou ágar MacConkey (MC; Kasvi). Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante. Quando indicado, os meios foram suplementados com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL), apramicina (100 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (20 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) ou tetraciclina (25 µg/mL). As soluções-estoques de antibióticos foram preparadas em solvente apropriado, esterilizadas por filtração em membranas de 0,2 µm (Millipore, EUA), e mantidas a -20 °C até o uso (SAMBROCK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Todos os estoques bacterianos foram mantidos a -20 °C ou -80 °C em caldo LB, acrescido de 40% de glicerol (Labsynth, Brasil).

Para a verificação da pureza dos estoques, as cepas bacterianas foram semeadas em caldo LB, sendo incubadas em estufa a 37 °C por 18 h. Em seguida, as amostras foram inoculadas em ágar MC e incubadas nas mesmas condições. Quando necessário, foram realizados testes bioquímicos para a confirmação da espécie, utilizando os meios de identificação bioquímica de enterobactérias EPM, MILi e ágar Citrato Simmons (Probac do Brasil, Brasil), os quais foram mantidos a 37 °C por 18 h.

3.3 Técnicas de biologia molecular

3.3.1 Extração de DNA genômico

O kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) foi empregado para a extração do DNA genômico das cepas bacterianas, segundo as recomendações do fabricante. Para a extração do DNA, as amostras foram inicialmente cultivadas em 3 mL de caldo LB a 37 °C por 18 h sob agitação de 250 rpm. Em seguida, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 16.000 x g por 5 min, e os sedimentos celulares foram submetidos a extração do DNA genômico e ressuspensos em 100 µL de água ultrapura esterilizada. Os DNAs obtidos foram mantidos a -20 °C até o momento de uso.

3.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em banho de gelo utilizando microtubos de 0,2 mL (Eppendorf, Alemanha). Como DNA molde foram utilizados: lisados bacterianos, obtidos a partir da fervura de uma suspensão em água ultrapura esterilizada de uma colônia bacteriana obtida em LBA, ou DNA genômico, extraído conforme descrito no item 3.3.1.

As PCRs foram realizadas no termociclador *ProFlex 3 x 32-well PCR System* (Applied Biosystems, EUA), empregando-se 20 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, EUA), 2 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (Invitrogen), 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen), 1 U de *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen), tampão da enzima 1 X (Invitrogen) e água ultrapura esterilizada em um volume final de 25 μ L. As PCRs envolvendo alta fidelidade de amplificação ou produtos de amplificação superiores a 1 kb, foram realizadas utilizando-se 20 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen), 2 mM de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (Invitrogen), 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen), 1 U de *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Invitrogen), tampão da enzima 1 X (Invitrogen) e água ultrapura esterilizada em um volume final de 50 μ L.

Em todas as PCRs, as reações foram submetidas a ciclos de desnaturação, hibridação e extensão (descritos a seguir em cada item específico). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo

Iniciador	Sequência (5'-3')	Descrição	Referência/fonte
4532-Fw	(F) AACAAAGACTCAGAGCACCGT	Mutação de <i>afpA</i> pelo vetor	Esse estudo
4532-Rv	(R) CATTAAACCCCGACACCACC	pJP5603	
4534-Fw	(F) TTTGCTTGGAGACATCGGTG	Amplificação do gene <i>afpB</i>	Esse estudo
4534-Rv	(R) TGATTACCCTGTCGCTTTCC		
FimH-Fw	(F) CTCACAATCAGCGCACTTCC	Amplificação do gene <i>fimH</i> com	Esse estudo
FimH-Rv	(R) CGCGTCTTATCTGGCCTACA	suas regiões <i>upstream</i> e	
		<i>downstream</i>	
FwRedFimH	(F) ATGAAACGAGTTATTACCCTGTTTGCTGTA CTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTCGCCTGTAAAACCTGTGTA GGCTGGAGCTGCTTCG	Mutação de <i>fimH</i> pelo sistema	Esse estudo
RvRedFimH	(R) TTATTGATAAACAAAAGTCACGCCAATAATCGATTGCACATT CCCTGCAGTCACCTGCCCTCCGGTACGTGCGTAATTTGCATAT GAATATCCTCCTTAG	λ Red	
FwAfpAXhol	(F) AATGCTCGAGATGAATATTTTTACAAAAAAG	Clonagem / complementação do	Esse estudo
RvAfpAHindIII	(R) TCACAAGCTTTTATTTTCAGCAGGAAGGT	gene <i>afpA</i>	
KAN-2 FP-1	(F) ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	Sequenciamento do local da	Epicentre
R6KAN-2 RP-1	(R) CTACCCTGTGGAACACCTACATCT	inserção do <i>transposon EZ-Tn5</i>	Technologies, EUA

(F) iniciadores *forward*; (R) iniciadores *reverse*

3.3.3 Eletroforese em gel de agarose e determinação da concentração de DNA

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Os géis de agarose foram preparados fundindo-se a agarose (Invitrogen), em tampão TBE 0,5x (Tris-borato 44,5 mM; ácido etilenodiaminotetracético [EDTA] 1 mM), na concentração final de 0,8%, 1% ou 1,5%, conforme indicado. Os produtos de amplificação foram acrescidos de tampão de corrida 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%) e os géis foram corados por solução de *GelRed* (Uniscience, EUA) na concentração de 1:20.000 ou *UniSafe Dye* (Uniscience), na mesma diluição. A corrida eletroforética foi realizada a 60 V/cm em tampão TBE 0,5x, utilizando como comparação da massa molecular do fragmento amplificado um dos seguintes marcadores: *1 kb plus DNA ladder* (Invitrogen), *Low Mass DNA ladder* (Invitrogen) ou *High Mass DNA ladder* (Invitrogen). Posteriormente, os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta UVP (Upland, San Leandro, EUA) e fotografados com o auxílio de sistema de imagem *Alliance HD 6* (Uvitec, Reino Unido).

O DNA em solução foi quantificado e analisado quanto a pureza por meio de leituras de densidade óptica (DO) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, as quais foram determinadas utilizando o aparelho *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific, EUA). A concentração de DNA foi expressa em ng/ μ L e a relação entre as leituras de 260 e 280 nm indicavam a pureza da amostra quando os valores se encontravam entre 1,8 e 2,0.

3.3.4 Extração do DNA plasmidial

Os kits *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega) e *PureYield Plasmid Midiprep System* (Promega) foram empregados para a extração do DNA plasmidial bacteriano em pequena e grande escala, respectivamente. Todas as extrações foram realizadas seguindo recomendações do fabricante.

Para as extrações de DNA plasmidial em pequena escala, as amostras foram inicialmente cultivadas em 3 mL de caldo LB a 37 °C por 18 h sob agitação de 250 rpm. Em seguida, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 16.000 x g por 5 min, e os sedimentos celulares foram submetidos a extração do DNA plasmidial e ressuspensos em 20 μ L de água ultrapura esterilizada. Para as extrações de DNA

plasmidial em larga escala, as amostras foram cultivadas em 100 mL de caldo LB, a 37 °C por 18 h sob agitação de 250 rpm, centrifugadas a 16.000 x g por 5 min, os sedimentos celulares submetidos a extração do DNA plasmidial e ressuspensos em 500 µL de água ultrapura esterilizada. Os DNAs plasmidiais extraídos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (item 3.3.3) e mantidos a -20 °C até o uso.

3.3.5 Transformação bacteriana

As células bacterianas competentes foram transformadas por meio da técnica de eletroporação, seguindo metodologia descrita por Ausubel et al. (1989), com algumas modificações.

As células competentes de *E. coli* foram preparadas em água destilada resfriada a 4 °C e mantidas a -80 °C em alíquotas de 50 µL de solução de glicerol a 10%. Assim, inicialmente, as cepas bacterianas foram inoculadas em 3 mL de caldo LB e incubadas a 37 °C por 18 h, com agitação de 250 rpm. Uma alíquota de 1 mL foi inoculada em 99 mL de caldo LB e a cultura incubada a 37 °C, sob agitação de 250 rpm, até a DO, medida em comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀), entre 0,6 e 0,7. Os valores de DO₆₀₀ foram aferidos no leitor de ELISA *Multiskan EX* (Labsystems, EUA). Em seguida, a cultura foi mantida em banho de gelo por 10 min, o volume total foi centrifugado a 1.700 x g por 10 min a 4 °C e o sedimento ressuspense em 20 mL de água destilada. A suspensão de células foi centrifugada nas mesmas condições e o sedimento ressuspense em 8 mL de água destilada. Mais uma vez, a suspensão foi centrifugada e o sedimento ressuspense em 1 mL de glicerol 10% gelado. Novamente, foi realizada uma nova centrifugação, o sedimento foi ressuspense em 500 µL de glicerol 10%, distribuído em alíquotas de 50 µL e estas foram armazenadas a -80 °C.

Para a transformação, as células eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo e a eletroporação foi realizada com 10 ng de DNA utilizando uma cubeta de eletroporação *Gene Pulser/MicroPulser Eletroporation Cuvetes* (BioRad, EUA) de 0,2 cm, previamente resfriada, a qual foi submetida a um pulso elétrico de 2.5 kV, 25 µF e controle de pulso de 200 Ω utilizando o equipamento *Gene Pulser II* (BioRad). Após a transformação, as bactérias recém-transformadas foram recuperadas em 1 mL de meio SOC (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; cloreto de sódio 10 mM; cloreto de potássio 2,5 mM; sulfato de magnésio 20 mM; cloreto de magnésio 10 mM; glicose

20 mM) a 37 °C por 1 h, com agitação de 250 rpm. Após a recuperação, 50 e 100 µL da suspensão bacteriana foram cultivados em placas de LBA, contendo o antibiótico apropriado para a seleção das cepas transformantes, e incubadas a 37°C por 18 h.

3.3.6 Sequenciamento por Sanger e análise das sequências de DNA

O sequenciamento automático foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo), utilizando o sequenciador automático *ABI 3730 DNA Analyser* (Thermo Fisher Scientific). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Thermo Fisher Scientific). Para edição das sequências de nucleotídeos foi utilizado o programa *SeqMan v4.5 (Expert Analysis Software DNA Star, Inc para PC, Madison, WI, USA)*. Em seguida, as sequências foram comparadas utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.5.3* (Carlsbad). As sequências foram analisadas pelo *BLAST* e pelo genoma anotado da cepa UPEC-46 (item 3.13).

3.4 Ensaios de interação com células epiteliais *in vitro*

3.4.1 Manutenção das células e preparo das microplacas

As linhagens de células HeLa (ATCC N° CCL-2), HT-29 (ATCC N° HTB-38) e 5637 (ATCC N° HTB-9) utilizadas nos ensaios de interação celular são originárias de adenocarcinoma de colo uterino humano, adenocarcinoma colorretal humano e carcinoma de bexiga humana, respectivamente.

As células HeLa e HT-29 foram cultivadas em garrafas plásticas de 25 cm² de área (Corning Costar), contendo 5 mL do meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM; Cultilab, Brasil) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab), enquanto as células 5637 foram mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) modificado (Cultilab), sob as mesmas condições. Ambas as linhagens foram mantidas durante 2 a 3 dias a 37 °C com uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂, até que atingissem confluência de aproximadamente 70%.

Para obtenção das microplacas com as monocamadas celulares, o meio de cultura das garrafas foi removido e a cultura lavada 3 vezes com tampão fosfato salina (PBS 1X [cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio

dibásico 4,3 mM; fosfato de potássio monobásico 1,5 mM]; pH 7,4), para retirada dos resíduos celulares. Em seguida, as monocamadas foram tripsinizadas com uma solução de 10 mM de EDTA e 0,25% de tripsina em tampão PBS 1X (Cultilab) e após forte agitação foram adicionados 5 mL do meio de cultivo apropriado (DMEM ou RPMI, ambos suplementado com 10% SFB), sendo a suspensão homogeneizada repetidas vezes. O número de células viáveis por mililitro foi determinado pelo método de exclusão com o corante azul de Tripan 0,5% (Prolab, Brasil), diluído em PBS 1X, utilizando uma câmara de Neubauer (Kasvi). A suspensão obtida foi ajustada por diluição de maneira a obter-se uma concentração final de $1,0 \times 10^5$ células viáveis/mL. Volumes de 1 mL foram transferidos para microplacas de cultura celular de 24 poços e 500 μ L foram transferidos para microplacas de cultura celular de 48 poços. Em ambas as placas, as células foram incubadas durante 48 h em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

3.4.2 Ensaio qualitativo de adesão

O padrão de aderência das cepas às células em cultura foi determinado por metodologia descrita por Cravioto et al. (1979), com modificações, utilizando dois períodos de infecção (3 e 6 h). Para o teste, as cepas bacterianas foram cultivadas em 3 mL de caldo LB a 37 °C por 18 h em cultura estática.

As monocamadas celulares (células HeLa, HT-29 ou 5637), dispostas em microplacas de cultura celular de 24 poços contendo lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro foram lavadas três vezes com PBS 1X. Após as lavagens, as células foram infectadas com $1,0 \times 10^7$ UFC/poço (em uma multiplicidade de infecção [MOI] de 100), ajustado para um volume de 20 μ L da cepa bacteriana em um volume final de 1 mL contendo os meios DMEM ou RPMI, suplementado com 2% de SFB. Quando necessário para o teste, os meios de cultura foram suplementados com 1% de D-manose (Inlab, Brasil). Para os ensaios de 6 h, após as três primeiras horas de incubação, as microplacas foram lavadas três vezes com PBS 1X, acrescidas com 1 mL dos respectivos meios, e incubadas por mais 3 h a 37°C.

Após o período total de infecção (3 ou 6 h) as placas foram lavadas 6 vezes com PBS 1X e fixadas com metanol 70% (Merck, Alemanha) por 30 min. Após a fixação, as células foram coradas por 5 min com solução corante eosina-azul de metileno em solução a 0,2% segundo May-Grünwald (Merck) diluído na razão 1:2 em

tampão de Sørensen, e em seguida esse corante foi desprezado sendo então acrescentada a solução corante azur-eosina-azul de metileno segundo Giemsa (Merck) diluída na razão 1:3 em tampão de Sørensen, por 20 min. Após lavagem com água, as lamínulas foram secas e montadas em lâminas de vidro (Knittel, Alemanha), utilizando o fixador Entellan (Merck), sendo analisadas por microscopia óptica comum. Estes testes foram realizados em duplicata. Como controles, foram utilizadas as cepas *E. coli* DH5 α (não aderente) e EAEC 042 (produtora do padrão AA).

3.4.3 Ensaio quantitativo de adesão e invasão

Ensaio quantitativo de adesão e invasão bacteriana nas linhagens celulares HeLa, HT-29 e 5637 foram realizados conforme descrito por Luck et al. (2005) em microplacas de cultura celular de 24 poços sem lamínulas.

O ensaio quantitativo de adesão foi realizado em períodos de infecção de 3 e 6 h, semelhante ao descrito no item 3.4.2. Para quantificar o número de bactérias aderentes às células epiteliais e superfície abiótica, o seguinte protocolo foi empregado: após os períodos de infecção e lavagens com PBS 1X para a remoção de bactérias não aderentes, as células epiteliais foram lisadas com 400 μ L da solução Triton X-100 (Sigma-Aldrich, EUA) diluída a 1% em PBS 1X. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, 600 μ L de PBS 1X foram adicionados a cada cavidade da placa e homogeneizados por pipetagem por dez vezes. Posteriormente, diluições seriadas em PBS 1X (de 10^1 até 10^8) foram semeadas em placas de ágar MC para contagem de colônias viáveis. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18 h e a quantificação bacteriana se deu pela contagem de UFC/poço.

Para o ensaio de invasão, a infecção bacteriana das culturas celulares (HeLa, HT-29 e 5637) foi realizada em períodos de 3 h na ausência de 1% D-manose. Após o período de infecção e lavagens com PBS 1X para a remoção de bactérias não aderentes, as células foram tratadas adicionando-se 1 mL do respectivo meio de cultura (DMEM ou RPMI) contendo 100 μ g/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) por 1 h para a eliminação de bactérias extracelulares. Em seguida, as monocamadas foram lavadas com PBS 1X e as células epiteliais lisadas com 400 μ L da solução de Triton X-100 diluída a 1% em PBS 1X. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente, 600 μ L de PBS 1X foi adicionado a cada cavidade da placa e homogeneizado pipetando dez vezes. As contagens de bactérias viáveis foram determinadas

plaqueando alíquotas em placas de ágar MC. O resultado foi obtido analisando o número total de bactérias associadas, por meio do ensaio quantitativo de adesão, descrito acima, e o número de bactérias internalizadas, obtidas neste protocolo. Assim para determinar o índice de invasão (%), foi utilizado o seguinte cálculo: número de bactérias internalizadas x 100 / número total de bactérias associadas.

Todos os ensaios quantitativos de adesão e invasão foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica. Para os ensaios de invasão, a cepa *S. flexneri* 2a foi utilizada como controle positivo e a cepa *E. coli* C600 foi utilizada como um controle não invasivo. Células epiteliais não infectadas foram utilizadas como controles em todos os experimentos.

3.5 Ensaio de formação de biofilme

3.5.1 Formação de biofilme utilizando diferentes superfícies e meios de cultivo

Para os ensaios de biofilme, inicialmente foram avaliados os períodos de incubação de 24 h a 37 °C. Nestes testes foram avaliadas duas condições de cultivo: meio DMEM suplementado com 0,4% de glicose (DMEM alta glicose; Cultilab) e meio DMEM pré-condicionado em células HeLa. Além disso, a formação de biofilme foi avaliada em duas diferentes superfícies abióticas: poliestireno e vidro. Em todos os ensaios foram avaliadas a cepa UPEC-46 juntamente com os controles positivo (EAEC 042) e negativo (*E. coli* DH5 α). Além disso, os ensaios foram realizados na presença e ausência de 1% metil α -D-manopiranosídeo (α -D-man; Sigma-Aldrich). Todos os testes foram realizados em triplicata biológica e triplicata técnica.

O preparo do meio DMEM pré-condicionado foi realizado conforme descrito por Munhoz et al. (2018). Resumidamente, este meio foi preparado por meio da incubação do meio DMEM na presença de monocamadas de células HeLa, com confluência de ~70%, e mantidas por 48 h a 37 °C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após este período, o sobrenadante (referido como meio pré-condicionado) foi coletado, ajustado ao pH 7,4, filtrado por uma membrana de poro de 0,2 μ m (Millipore) e mantido a -20 °C até o momento do uso.

A formação de biofilme em superfície abiótica de poliestireno foi aferida a partir do protocolo descrito por Sheikh et al. (2001), utilizando para isso microplacas de cultura celular de 96 poços (Corning Costar, EUA). Para este ensaio, alíquotas de 2

μL das culturas bacterianas, inicialmente cultivadas em condições estáticas por 18 h a 37 °C em caldo LB, foram inoculadas em 198 μL (diluição 1:100) do meio apropriado (DMEM alta glicose ou DMEM pré-condicionado) e então incubadas a 37 °C por 24 h. Após a incubação, o meio de cultura foi desprezado e cada poço da microplaca foi lavado três vezes com tampão PBS 1X. Em seguida, as células sésseis foram fixadas com 200 μL de etanol (Labsynth) diluído a 75%, durante 10 min. Após este período, o etanol foi desprezado e cada poço corado por 5 min com 200 μL de uma solução 0,5% de cristal violeta (Laborclin, Brasil) diluída em etanol absoluto. As placas foram então lavadas quatro vezes com PBS 1X e secas à temperatura ambiente. A formação de biofilme foi quantificada dissolvendo-se o cristal violeta retido pelos biofilmes em 200 μL de etanol 95% durante 2 min. Finalmente, a DO foi aferida por meio da leitura da absorvância de cada poço, em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 595 nm (DO_{595}).

Para os ensaios realizados em superfície abiótica de vidro foram utilizadas microplacas de cultura celular de 24 poços (Corning Costar) contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Knittel). Para este ensaio foram inoculados 10 μL das culturas bacterianas, inicialmente cultivadas em condições estáticas por 24 h a 37 °C em caldo LB em um volume de 990 μL do meio de cultura apropriado (diluição 1:100). Após a incubação, cada poço foi lavado três vezes com PBS 1X, fixado com 1 mL de etanol 75% por 10 min, corado com 1 mL da solução de cristal violeta 0,5% por 5 min, lavado quatro vezes com PBS 1X, e as placas foram deixadas secando a temperatura ambiente. Para a etapa de solubilização, foram adicionados 1 mL de etanol 95% em cada poço das microplacas de 24 poços, e após 10 min de solubilização, 200 μL foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a leitura de absorvância de cada poço realizada em leitor de ELISA na DO_{595} .

A amostra bacteriana foi considerada formadora de biofilme por meio das análises da média e desvio padrão do controle negativo (*E. coli* DH5 α), conforme estabelecido por Stepanović et al. (2007). Assim, amostras bacterianas apresentando uma DO_{595} superior à média mais três vezes o desvio padrão da DO_{595} do controle negativo foram consideradas formadoras de biofilme. Em todos os ensaios, as leituras de DO_{595} para cada amostra obtida foi considerada após descontar a média das leituras do branco (meio de cultura) correspondente.

3.5.2 Cinética da formação de biofilme

Além dos ensaios iniciais de formação de biofilme avaliando diferentes superfícies abióticas e meios de cultivo em períodos de incubação de 24 h, foi avaliada a cinética da formação de biofilme utilizando para isso a cepa bacteriana UPEC-46 juntamente com os controles positivo (EAEC 042) e negativo (*E. coli* DH5 α). Para este ensaio utilizou-se como condição de cultivo o meio DMEM alta glicose, na presença e ausência de 1% α -D-man. Os testes foram realizados em triplicata técnica e triplicata biológica.

Os ensaios da cinética de formação de biofilme foram realizados em superfície abiótica de poliestireno, utilizando para isso microplacas de cultura celular de 96 poços. As cepas bacterianas foram avaliadas quanto à formação de biofilme utilizando o mesmo protocolo descrito no item 3.5.1, com algumas modificações no cultivo bacteriano inicial. Para este cultivo inicial, alíquotas de 5 μ L das culturas bacterianas, inicialmente cultivadas em condições estáticas por 18 h a 37 °C em caldo LB, foram inoculadas em 195 μ L do meio DMEM alta glicose (diluição 1:40), e incubadas a 37 °C. Foram analisados cinco diferentes intervalos de cultivo: 3, 6, 9, 12 e 24 h. Após estes períodos, as culturas bacterianas foram lavadas, fixadas, coradas e solubilizadas para leitura de absorbância a uma DO₅₉₅. Em todos os ensaios, as leituras de DO₅₉₅ para cada amostra obtida foi considerada após descontar a média das leituras do branco (meio de cultura) correspondente.

3.6 Análise da expressão de curli

A metodologia descrita por Castonguay et al. (2006) foi empregada para verificar a produção de fímbria curli. Inicialmente, as amostras bacterianas foram cultivadas por 18 h a 37 °C em caldo LB sem agitação. Após este período, uma alíquota de 10 μ L de cada cepa bacteriana avaliada foi aplicada sobre placas de ágar vermelho Congo (ágar 2%, ácido casamino 1%, extrato de levedura 0,15%, sulfato de magnésio 0,005%, suplementadas com 40 μ g/mL de vermelho Congo [Merck] e 20 μ g/mL de azul brilhante de Coomassie G250 [Merck]) e incubadas por 48 h a 26 °C ou 24 h a 37 °C. Após a incubação, foi observada a expressão fenotípica da fímbria curli, onde as amostras que apresentaram colônias com coloração avermelhada foram consideradas positivas e as que apresentaram colônias esbranquiçadas foram

consideradas negativas. Para este teste foram utilizadas a cepa UPEC-46 juntamente com o controle positivo (E2348/69) e o controle negativo (*E. coli* DH5 α).

3.7 Produção de celulose

A verificação da produção de celulose foi realizada de acordo com o método descrito por Römling et al. (2003). As amostras bacterianas foram previamente cultivadas em caldo LB a 37 °C por 18 h sem agitação. Após este período, as amostras foram semeadas em LBA modificado (ágar 2%, triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; suplementado com 50 μ M do corante Calcofluor [*Fluorescent Brightener 28*; Sigma Aldrich]). A indicação da produção de celulose foi verificada por meio da observação de colônias bacterianas fluorescentes no transiluminador de luz ultravioleta UVP a 366 nm, após 48 h de incubação a 26 °C ou 24 h a 37 °C. Além da cepa UPEC-46, as cepas BA320 e *E. coli* DH5 α foram utilizadas como controle positivo e controle negativo, respectivamente.

3.8 Ensaio de produção de hemolisinas

O ensaio de produção de hemolisina foi adaptado do protocolo descrito por Beutin et al. (1991). Para este ensaio, placas de ágar sangue foram preparadas com ágar base de tiptcaseína de soja (TSA; Difco, EUA) 1,5%, suplementado com 10 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂) e 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov, Brasil). Para a detecção da atividade hemolítica as amostras bacterianas foram cultivadas em caldo LB por 18 h a 37 °C sem agitação e, posteriormente, semeadas nas placas de ágar sangue. As placas foram então examinadas após 3 e 24 h de incubação a 37 °C para a análise da presença de zonas de hemólise ao redor do crescimento bacteriano. A presença de hemólise em até 3 h de incubação foi considerado como indicativo da produção de α -hemolisina, enquanto a hemólise apenas após 24 h foi indicativa da produção de enterohemolisina. As cepas J96 e *E. coli* DH5 α foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.9 Análise da produção de bacteriocinas

Os ensaios de produção de bacteriocinas foram baseados no método proposto por Pugsley; Oudega (1987), com algumas modificações. Inicialmente, uma cultura em caldo LB por 18 h a 37 °C sem agitação da cepa de *E. coli* C600, utilizada como cepa indicadora para a produção de bacteriocinas, foi adicionada em uma diluição 1:100 em LBA a 50 °C e distribuída em uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro. Após a secagem da placa, 10 µL e 2 µL de uma cultura previamente cultivada em LB, a 37 °C por 18 h sem agitação das cepas a serem testadas foram adicionadas à superfície do ágar na placa recém preparada e incubadas por 18 h a 37 °C. Após a incubação, um halo claro indicando inibição do crescimento da cepa indicadora ao redor da colônia da cepa avaliada indicava a produção de bacteriocinas. Neste ensaio foram testadas a cepa UPEC-46 e, como controle negativo foi utilizada a cepa *E. coli* DH5α.

3.10 Resistência à atividade bactericida do soro

A resistência à atividade bactericida do soro da cepa UPEC-46 foi avaliada conforme proposto por Henderson et al. (1999a), com algumas modificações. Pré-inóculos das cepas UPEC-46 e *E. coli* DH5α (utilizada como controle de morte) foram preparados em caldo LB e incubados a 37 °C por 18 h. Ao fim deste período, uma diluição 1:100 dos pré-inóculos foram transferidos para volumes finais de 50 mL em caldo LB e incubados a 37°C, com agitação de 250 rpm, até que os inóculos atingissem a DO₆₀₀ de 0,5.

Imediatamente, 20 µL das suspensões bacterianas foram misturados em microtubos de 1,5 mL (Eppendorf) contendo soro humano normal comercial (Sigma-Aldrich), diluído a 50% em PBS 1X, em um volume final de 200 µL, e incubados a 37 °C por até 60 min. Além do soro humano normal comercial, as culturas bacterianas foram avaliadas na presença desse mesmo soro humano inativado pelo calor (56 °C por 30 min). Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 30 e 60 min, e as contagens de células viáveis foram determinadas plaqueando essas alíquotas em placas de ágar MC usando diluições em série (1:10), diluídas em PBS 1X. Os resultados foram expressos em UFC/mL. Os ensaios de resistência à atividade bactericida do soro foram realizados em triplicata biológica.

3.11 Imunodeteção da proteína Pet

A imunodeteção de Pet foi realizada utilizando as proteínas do sobrenadante de cultura das cepas UPEC-46, EAEC 042 (controle positivo) e BA732 (controle negativo), precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 20%, e a fração enriquecida em IgG de um soro policlonal de coelho anti-Pet (VILHENA-COSTA et al., 2006). Esse antissoro foi gentilmente cedido pela Dra. Roxane Piazza (Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan). Primeiramente, as cepas bacterianas foram cultivadas em 5 mL de meio DMEM (Cultilab) sob agitação de 225 rpm por 18 h a 37 °C. Após essa etapa, a cultura foi centrifugada a 16.000 x g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante coletado e fracionado em alíquotas de 1 mL. Em cada alíquota foi adicionado 1 mL de TCA, seguido de incubação a 4 °C por 18 h. Uma centrifugação a 16.000 x g a 4°C foi realizada posteriormente e as proteínas precipitadas foram lavadas com 500 µL de acetona gelada, submetidas à centrifugação, conforme descrito anteriormente, e o precipitado deixado a temperatura ambiente para a evaporação dos resíduos de acetona.

Os precipitados resultantes foram ressuspensos em solução de Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8 (volume final de 15 µL), contendo tampão de corrida (aminometano hidrocloreto 0,25 M; dodecil sulfato de sódio 8%; glicerol 80%; azul de bromofenol 0,04%; pH 6,8), acrescido de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:6, e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12% em condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970). Os géis foram preparados em duplicata e a eletroforese realizada a 120 V por 1 h em tampão Tris-Glicina (tris [hidroximetil] aminometano 3%; glicina 14%; dodecil sulfato de sódio 1%).

Um dos géis resultantes foi corado utilizando a coloração com solução de nitrato de prata, conforme previamente descrito (CHEVALLET; LUCHE; RABILLOUD, 2006). Primeiramente, as proteínas contidas no gel (SDS-PAGE) foram fixadas com 50% de metanol, 12% de ácido acético e 37% de formaldeído por 18 h, seguido de 4 lavagens de 20 min em solução 30% de metanol. Em seguida, o gel foi incubado com solução de 0,02% de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) por 1 min. Posteriormente, o gel foi lavado 3 vezes com água destilada por 30 seg. Após as lavagens, o gel foi incubado com 0,2% de nitrato de prata por 20 min, seguido de 3 lavagens com água destilada, e posteriormente foi adicionada uma solução reveladora contendo 0,05% de formaldeído e 3% de carbonato de sódio (Na_2CO_3) até o aparecimento das bandas proteicas. A reação foi interrompida com 12% de ácido acético em 50% de metanol e

o gel mantido em uma solução com 50% de etanol e 10% de glicerol. Todas as etapas da coloração foram realizadas sob leve agitação.

O segundo gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, EUA) pela técnica de *Western Blotting* (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). A transferência do conteúdo proteico para a membrana foi realizada com auxílio do sistema *Trans-Blot SD Semi-Dry* (BioRad, EUA), utilizando o tampão de transferência (200 mL de metanol, 100 mL de Tris-glicina e 700 mL de água destilada) em corrente elétrica constante de 10 V por 40 min. A membrana resultante do *Western Blotting* foi incubada a 4°C por 18 h na solução de bloqueio, contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) em PBS 1X com 0,05% de Tween-20 (PBS-Tw; Sigma-Aldrich). Em seguida, a mesma foi lavada três vezes com PBS-Tw, à temperatura ambiente, sob agitação por 5 min. Posteriormente, a membrana foi incubada com 20 mL de uma solução contendo 2,5% de leite desnatado em PBS-Tw, na diluição 1:1.000 do soro policlonal de coelho anti-Pet (VILHENA-COSTA et al., 2006) por 1 h, sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS-Tw e a membrana foi então incubada com 20 mL de uma solução contendo 2,5% de leite desnatado em PBS-Tw, na diluição 1:5.000 do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) por 1 h, sob agitação, em temperatura ambiente. A revelação foi feita com solução de 3-3'-Diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) preparada em tampão Tris 0,05 M e pH 7,6, adicionada de água oxigenada (H₂O₂), conforme recomendações do fabricante.

3.12 Sequenciamento do genoma completo da cepa UPEC-46

O sequenciamento do genoma completo da cepa UPEC-46 foi realizado utilizando duas diferentes plataformas de sequenciamento. A primeira foi a plataforma *HiSeq 1500® System* (Illumina, EUA), obtendo-se sequências de leitura curta (*short-reads*), e a segunda foi a plataforma *MinION* (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido), obtendo-se sequências de leitura longa (*long-reads*).

O sequenciamento utilizando o sistema *Illumina* foi realizado no Laboratório de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan, com a colaboração do Dr. Enéas de Carvalho (Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan). Após a extração do gDNA da cepa UPEC-46 (item 3.3.1), ele foi quantificado com auxílio do kit *PicoGreen* (Thermo Fisher Scientific) e avaliado quanto a sua integridade em um

equipamento de eletroforese de microvolumes (*Bioanalyzer Instrument*, Agilent, EUA). Após a quantificação e análise de qualidade do DNA extraído, o sequenciamento foi realizado utilizando kits de preparação de biblioteca, clusterização e sequenciamento da *Illumina*, sempre seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante. Para isso, foram utilizados os seguintes kits disponibilizados pela *Illumina*: *Nextera XT DNA Library Preparation Kit (24 samples)*; *Nextera XT Index Kit (24 indexes, 96 samples)*; *HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2* e *HiSeq Rapid SBS Kit v2 (500 cycles)*. Em resumo, o DNA foi fragmentado em tamanhos compatíveis com a metodologia (~ entre 150 e 1.000 pb), ao mesmo tempo em que adaptadores foram ligados aos fragmentos produzidos. Para a etapa de clusterização e sequenciamento, as bibliotecas foram adicionadas à placa de sequenciamento que contém ancoradas a si, sequências homólogas aos adaptadores; uma reação de amplificação foi realizada para aumentar o número de cópias de cada fragmento, gerando, assim, os agrupamentos. Após esta etapa, foram adicionados os reagentes para o sequenciamento em si, com a presença de nucleotídeos marcados com fluoróforos. Uma vez obtidas as sequências, elas foram pré-processadas com o software *Casava v1.8* (*Illumina*), e então utilizadas para a montagem dos genomas.

O sequenciamento utilizando o sistema *MinION* foi realizado no Laboratório de Plasticidade do Genoma Microbiano, no Instituto para Higiene da Universidade de Münster (Alemanha), com a colaboração do Dr. Ulrich Dobrindt. Inicialmente, o DNA genômico da cepa UPEC-46 foi extraído usando o kit *MagAttract HMW DNA* (*Qiagen*, Alemanha). Após a quantificação e análise de qualidade do DNA extraído, a preparação da biblioteca foi realizada utilizando o kit *Nanopore Ligation Sequencing* (*Oxford Nanopore Technologies*) e a biblioteca foi sequenciada por meio da *R9.4.1 MinION flow cell* durante 24 h de corrida utilizando o programa *MinKNOW v2.0*, sempre seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante. Os arquivos *FAST5* foram convertidos para o formato *FASTQ*, em tempo real, usando o programa *Guppy v3.3.0* (*Oxford Nanopore Technologies*). Antes da montagem, a qualidade das leituras brutas foi verificada pelo programa *FastQC v0.11.5* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), e as leituras de baixa qualidade foram cortadas usando o programa *Sickle v1.33* (<https://github.com/najoshi/sickle>). As sequências de leitura longa foram então filtradas por qualidade usando o programa *Filtlong v0.2.0*

(<https://github.com/rrwick/Filtlong>), ajustado nos parâmetros: `--min_length 1000, --keep_percent 90, --target_bases 500000000`.

3.13 Montagem do genoma

A montagem do genoma da cepa UPEC-46, empregando os resultados obtidos em ambos os sequenciamentos (*Illumina* e *MinION*) foi realizada utilizando o programa *Unicycler* v0.4.8 (WICK et al., 2017). Este programa realiza diversas etapas de análise para a montagem do genoma bacteriano, utilizando para isso um pacote com vários programas pré-instalados. Resumidamente, o *Unicycler* realizou uma montagem inicial do genoma da cepa UPEC-46, por meio do software *SPAdes* v3.6.2, utilizando para isso as sequências de leitura curta obtidas pela plataforma *Illumina*. Em seguida, foi utilizado os alinhamentos de leitura longa, obtidos pela plataforma *MinION*, para agrupar os *contigs* e criar uma montagem finalizada. Além disso, os pequenos erros de bases nucleotídicas foram corrigidos por meio de múltiplas rodadas de polimento de leitura curta usando os programas *Pilon* v1.23, *Bowtie2* v2.3.5.1 e *SAMtools* v1.3.1. A montagem do genoma foi analisada usando o programa *QUAST* v4.3 (GUREVICH et al., 2013) e *contigs* menores que 500 pb foram descartados. Os *contigs* plasmidiais foram rotacionados para a inicialização no gene de replicação plasmidial *repA*, utilizando para isso o software *BLASTn+* v2.2.28 (CAMACHO et al., 2009). Por fim, a geração das imagens circulares das sequências dos plasmídios foram obtidas pelo programa *DNAPlotter* v18.0.0 (CARVER et al., 2009).

3.14 Anotação e análises genômicas

A determinação das sequências de DNA codificante (CDS, *coding DNA sequence*) e anotação do genoma da UPEC-46 foi realizado com o auxílio do programa *Prokka* v1.12 (SEEMANN, 2014).

Para a determinação dos fatores de virulência presentes na cepa UPEC-46, foram pesquisadas 1.154 sequências de proteínas deduzidas de genes associados à virulência (LEIMBACH, 2016b). Uma pesquisa automatizada de homólogos de proteínas em genomas bacterianos anotados e a identificação de fatores de virulência presentes ou ausentes foram processadas com o *pipeline* '*prot_finder*' da coleção de '*bac-genomics-scripts*' usando o programa *BLASTp+* v2.2 com as seguintes opções:

$1,0 \times 10^{-10}$ de ponto de corte para o valor E (*'-evaluate 1e-10'*), 70% de ponto de corte para a identidade e cobertura (LEIMBACH, 2016a). Esta opção incluiu valores altos de identidade e cobertura para as proteínas CDS pesquisadas. Uma matriz binária de presença/ausência desses resultados foi criada com *prot_binary_matrix* v0.6 e *transpose_matrix* v0.1. Um painel com as principais características dos fatores de virulência pesquisados encontra-se disponível no repositório do GitHub do banco de dados *ecoli VF collection* v0.1 (http://github.com/aleimba/ecoli_VF_collection).

Cada sequência atribuída como fator de virulência para a UPEC-46 por meio da análise pelo *ecoli VF collection* foi submetida manualmente a uma pesquisa mais aprofundada usando o *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>) para validar os fatores de virulência, para obter todas as informações sobre os genes de virulência detectados, avaliar a integridade da sequência e determinar sua homologia em relação à proteína *RefSeq* no *Swiss-Prot*.

Além disso, o *draft* genômico obtido após a montagem do genoma da cepa UPEC-46 foi submetido a várias plataformas *online* de bioinformática, disponíveis no site do *Center for Genomic Epidemiology* (<http://www.genomicepidemiology.org>), para determinar o filogrupo (baseado no método de Clermont, *Clermont Typing* v1.4.1) (BEGHAIN et al., 2018); o sorotipo (*SerotypeFinder* v2.0) (JOENSEN et al., 2015); presença e tipo de origens de replicação plasmídicas (*PlasmidFinder* v2.1) (CARATTOLI et al., 2014); presença de genes de resistência a antimicrobianos (*ResFinder* v3.2) (ZANKARI et al., 2012) e o *sequence type* (ST), de acordo com a base de dados de MLST da Universidade de Warwick, Reino Unido (*MLST* v2.0) (LARSEN et al., 2012).

Por fim, o programa *PHASTER* (*PHAge Search Tool Enhanced Release*) (ARNDT et al., 2016) foi usado para detectar sequências de profagos em cada *contig* do *draft* do genoma cromossomal e nos *contigs* correspondentes aos plasmídios encontrados.

3.15 Análises filogenéticas baseadas em SNP

Os diferentes filogramas construídos neste estudo foram obtidos usando a filogenia baseada em polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*), empregando o *draft* genômico da cepa de referência UPEC-46 e

diversas sequências de genoma completo de cepas de *E. coli* selecionadas nas bases de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Sendo assim, três diferentes filogramas foram construídos, sendo o primeiro utilizado para comparar a relação filogenética da cepa UPEC-46 com diferentes cepas de *E. coli* (comensais, ambientais, DEC e ExPEC) que representam as principais linhagens filogenéticas (A, B1, B2, C, D, E e F) e STs, presentes em coleções de cepas de *E. coli* de referência. Na segunda análise filogenética comparou-se a relação da UPEC-46 com diferentes cepas de *E. coli* classificadas como EAEC e UPEC, pertencentes a diversos filogrupos e STs. A seleção e classificação das cepas em UPEC baseou-se no sítio de isolamento e presença de ITU, de acordo com critérios já estabelecidos na literatura (KÖHLER; DOBRINDT, 2011). Cepas de EAEC foram classificadas com base na presença do padrão AA em células epiteliais e/ou presença dos marcadores genéticos plasmidiais *aatA* e *aggR* (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014). Em ambos filogramas construídos foram utilizadas quatro cepas de *Shigella* spp. e uma *Escherichia fergusonii* como grupo externo (*outgroups*). Por último, o terceiro filograma foi criado comparando-se a cepa UPEC-46 e outras cepas de *E. coli* pertencentes ao ST10. Nessa análise filogenética, apenas a cepa *E. fergusonii* foi utilizada como *outgroup*. Informações relacionadas ao número de acesso do *GenBank*, patótipo, filogrupo, ST, país e fonte de isolamento, tipo de hospedeiro e sorotipo, referentes às diferentes cepas de *E. coli* utilizadas para a construção da primeira, segunda e terceira árvore filogenética estão listadas nos Apêndices A, B e C, respectivamente.

Para os filogramas baseados em SNP, os alinhamentos do *core* genômico foram gerados com o programa *Snippy* v3.1.0 (<http://github.com/tseemann/snippy>) usando as opções padrão. Resumidamente, as leituras foram mapeadas usando o programa *bwa mem* v0.7 para o genoma de referência (genoma da cepa UPEC-46) e os alinhamentos brutos foram processados com o programa *SAMtools* v1.3.1. Os genomas derivados de SNP foram reconstruídos usando o programa *vcftools* v0.1.14 e as posições de referência degeneradas filtradas. As regiões recombinantes foram removidas usando a ferramenta *Gubbins* v2.20 (CROUCHER et al., 2015), produzindo *core* genômicos alinhados. A partir desse alinhamento, os filogramas foram inferidos pela máxima probabilidade usando o programa *RAxML* v8.2.9 (STAMATAKIS, 2014), utilizando 1.000 replicações de inicialização/reamostragem. Os três filogramas

construídos foram visualizados com a ferramenta online *iTOL* v4 (LETUNIC; BORK, 2019).

3.16 Análises *in silico* para AFP

3.16.1 Pesquisa das cepas AFP positivas

Primeiramente, todas as sequências genômicas completas disponíveis publicamente no NCBI foram rastreadas quanto à presença dos genes associados a adesina AFP. Após esta etapa, todos os genes associados ao *operon afp* (*afpAGBCUDEFPHIJKLA2*), bem como o gene *afpR* (regulador da família AraC), presentes nas cepas AFP positivas foram comparados individualmente com base em suas sequências nucleotídicas e de aminoácidos com a cepa UPEC-46, por meio do programa *BLASTn+* v2.2.28.

Além disso, os *drafts* genômicos das cepas selecionadas foram analisados para determinar o filogruppo baseado no método de Clermont, o sorotipo, presença e tipo de origem de replicação de plasmídeo, presença de genes de resistência a antimicrobianos e o ST de acordo com o descrito no item 3.14.

3.16.2 Identificação de genes associados à virulência

Para a determinação dos principais fatores de virulência presentes nas cepas AFP positivas, uma análise da presença/ausência de 398 fatores, particularmente associados a genes de adesinas e outros fatores de virulência bacterianos descritos em diferentes grupos de *E. coli*, tais como comensal, DEC e ExPEC, foi realizada utilizando o banco de dados *ecoli VF collection* v0.1.

Os 398 fatores de virulência selecionados correspondem aos principais fatores dentre todas as sequências depositadas naquele programa. A pesquisa automatizada destes fatores de virulência em homólogos de proteínas nos genomas AFP positivos anotados e a criação da matriz binária de presença/ausência desses fatores foi realizado conforme descrito no item 3.14.

Além disso, uma árvore filogenética para as cepas AFP positivas foi obtida, baseando-se no descrito no item 3.15 juntamente com o resultado do painel dos fatores de virulência. A árvore filogenética foi inferida pela máxima probabilidade

usando o programa *RAxML* v8.2, utilizando 1.000 replicações de inicialização/reamostragem. Um mapa de calor (*heat map*) da matriz binária de presença/ausência correspondente aos 398 fatores de virulência pesquisados, alinhados de acordo com o filograma das cepas AFP positivas, foi gerada usando a ferramenta online *iTOL* v4.

3.17 Construção da cepa mutante em *afpA* utilizando o vetor pJP5603

*3.17.1 Obtenção do inserto, clonagem, transformação e seleção de clones contendo o inserto *afpA* no vetor pGEM-T Easy*

Para a obtenção do mutante isogênico em *afpA*, a partir da cepa UPEC-46, foi utilizada a técnica de recombinação homóloga com auxílio do vetor suicida pJP5603 (PENFOLD; PEMERTON 1992). Para isso, inicialmente foi necessária a clonagem do gene *afpA* no vetor pGEM-T Easy (Promega), para a inserção de sítios de restrição a endonuclease EcoRI (Invitrogen) nas extremidades do fragmento amplificado, conforme descrito a seguir.

Primeiramente, a amplificação do inserto do fragmento interno do gene *afpA*, contendo 307 pb, a partir da amostra UPEC-46 foi efetuada por meio da reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 4532-Fw e 4532-Rv (**Tabela 2**). A PCR foi realizada de acordo com o item 3.3.2 seguindo as seguintes condições: uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94 °C 1 min, 56 °C 1 min e 72 °C 1 min), com uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (item 3.3.3), e após a eletroforese, o fragmento de DNA obtido foi purificado utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

O fragmento purificado foi clonado no vetor comercial pGEM-T Easy (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de inserto adicionado à mistura comercial foi calculada de forma que representasse, aproximadamente três vezes a concentração do vetor (3:1). O plasmídeo resultante da reação de ligação inseto/vetor foi denominado pPAS1.

Células competentes de *E. coli* DH5α foram então transformadas por eletroporação (item 3.3.5) com o plasmídeo recombinante e os transformantes

selecionados em LBA contendo canamicina (50 µg/mL), 1 mM de isopropil β-D-tiogalactopiranoside (IPTG; Sigma-Aldrich) e 40 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-Gal; Sigma-Aldrich). Após incubação a 37 °C por 18 h, colônias resistentes à canamicina e que não metabolizaram o X-Gal (colônias brancas) foram selecionadas para confirmação da clonagem do fragmento do gene *afpA* por PCR (item 3.3.2). Após análise em eletroforese em gel de agarose a 1,5% (item 3.3.3), um clone apresentando o produto de amplificação correspondente ao fragmento do gene *afpA* foi selecionado para o cultivo em caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL), sendo em seguida mantido a -80 °C com 40% de glicerol acrescido ao cultivo. Esse clone foi então denominado DH5α(pPAS1).

O plasmídio pPAS1 presente no clone DH5α(pPAS1) foi submetido à extração do DNA plasmidial, e o plasmídio pPAS1 extraído foi digerido com a enzima de restrição EcoRI (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante, durante 3 h de incubação a 37 °C. Em seguida as digestões foram avaliadas por corrida eletroforética em gel de agarose a 1% (item 3.3.3). Após confirmação da digestão, os fragmentos contendo as regiões flanqueadas pelas sequências de restrição para EcoRI (Invitrogen), foram purificados a partir do gel utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e quantificados. Por fim, os fragmentos foram mantidos a -20 °C para posterior subclonagem no vetor suicida pJP5603.

3.17.2 Subclonagem, transformação e seleção de clones contendo o inserto *afpA* no vetor pJP5603

Inicialmente, o plasmídio pJP5603 foi digerido com a enzima de restrição EcoRI (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. O inserto do gene *afpA*, flanqueado pela região de restrição para a enzima EcoRI, foi liberado do vetor pGEM-T *Easy* e religado ao vetor pJP5603 utilizando a *T4 DNA ligase* (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. A partir desta ligação foi obtido o plasmídio pPAS2. Células competentes de *E. coli* S17-1(λpir) foram transformadas com este plasmídio por eletroporação (item 3.3.5). Após serem recuperadas, as bactérias transformadas foram semeadas em placas contendo canamicina (50 µg/mL), IPTG (1 mM) e X-Gal (40 µg/mL) e incubadas a 37°C por 18 h.

As colônias recombinantes que apresentaram resistência à canamicina e não metabolizaram o X-Gal (colônias brancas) foram selecionadas para confirmação da clonagem do fragmento do gene *afpA*, por meio de uma PCR (item 3.3.2) com os iniciadores 4532-Fw e 4532-Rv (**Tabela 2**). Após análise em eletroforese em gel de agarose a 1% (item 3.3.3), um clone apresentando um produto de amplificação correspondente ao fragmento do gene *afpA* foi selecionado para o cultivo em caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL), sendo em seguida mantido a – 80 °C com 40% de glicerol acrescido ao cultivo. Esse clone foi denominado S17-1(λ pir) (pPAS2).

3.17.3 Conjugação da amostra S17-1(λ pir) (pPAS2) com a cepa UPEC-46

A transferência do plasmídeo pPAS2 para a cepa UPEC-46 foi realizada por conjugação, segundo metodologia descrita por Salvador (2006), com algumas modificações. Primeiramente, a cepa S17-1(λ pir) (pPAS2) resistente à canamicina (denominada doadora), e UPEC-46, resistente a tetraciclina (denominada receptora), foram cultivadas separadamente por 18 h a 37 °C, sem agitação, em 3 mL de caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL) e tetraciclina (25 µg/mL), respectivamente. Em seguida, 1 mL de cada um dos cultivos foi misturado e aproximadamente 100 uL desta mistura foram distribuídos sob a superfície de membranas de filtração de poro 0,45 µm (Millipore), as quais foram dispostas sobre placas de Petri contendo ágar MC. Após incubação por 18 h a 37 °C, o crescimento sobre cada uma das membranas foi ressuspensão em 5 mL de caldo LB, e posteriormente 200 uL de cada suspensão foram semeadas em placas de ágar MC contendo canamicina (50 µg/mL) e tetraciclina (25 µg/mL), sendo as placas incubadas a 37 °C por 18 h. As colônias resistentes à canamicina e tetraciclina selecionadas foram estocadas em meio LB a -80 °C com 40% de glicerol.

3.17.4 Ensaios para a confirmação da mutação isogênica de *afpA*

Os conjugantes selecionados foram avaliados inicialmente pelos testes bioquímicos para identificação da espécie *E. coli* (EPM, MILi e Citrato Simons), da capacidade de fermentação da lactose, por meio do cultivo em ágar MC, e a resistência aos antibióticos canamicina e tetraciclina (item 3.2). Além disso, para confirmar a identidade dos conjugantes, foi realizada uma PCR (item 3.3.2) para o

gene *afpB* (gene do operon *afp*) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 4534-Fw e 4534-Rv (**Tabela 2**), e as seguintes condições: uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94 °C 1 min, 56 °C 1 min e 72 °C 1 min), com uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos de amplificação das cepas conjugantes para o gene *afpB* foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1%, conforme descrito no item 3.3.3.

Após a confirmação das características bioquímicas e moleculares referentes à cepa UPEC-46, uma cepa conjugante foi selecionada e submetida ao sequenciamento de nucleotídeos para a confirmação da inserção do vetor pJP5603 no gene *afpA*.

Para o sequenciamento, primeiramente foi realizada a extração do DNA genômico dessa cepa conforme descrito no item 3.3.1. Uma PCR foi realizada para a amplificação da inserção do vetor pJP5603 no gene *afpA*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FwAfpAXhol e RvAfpAHindIII (**Tabela 2**), conforme descrito no item 3.3.2. O seguinte ciclo de amplificação foi utilizado: uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min; 35 x (94°C/30 seg; 56°C/30 seg; 68°C/4 min) com uma extensão final de 68°C 7 min. Essa combinação de iniciadores e tempo de extensão foi o suficiente para a amplificação de um fragmento superior a 4 kb a partir do *codon* de iniciação (ATG) até o *codon* de terminação do gene *afpA*, na cepa mutante em *afpA*. As amplificações dos fragmentos das PCR foram avaliadas em gel de agarose 0,8% (item 3.3.3) e purificados do gel de agarose com auxílio do kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), para posterior sequenciamento de nucleotídeos, realizado conforme descrito no item 3.3.6.

3.18 Construção do plasmídio de complementação em *afpA*

O mutante em *afpA* (item 3.17) foi complementado utilizamos o vetor de baixo número de cópias pACYC177 (CHANG et al., 1978) (**Tabela 1**) contendo o gene *afpA* da cepa UPEC-46 para complementação.

Para isso, inicialmente o gene *afpA* foi amplificado por PCR empregando-se o DNA genômico da cepa UPEC-46, conforme descrito no item 3.3.1, e os iniciadores FwAfpAXhol e RvAfpAHindIII (**Tabela 2**). Para a PCR foram utilizadas as seguintes condições: uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94 °C 1 min, 56 °C 1 min e 72 °C 1 min), com uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os

produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (item 3.3.3), e após a eletroforese, o fragmento de DNA obtido foi purificado utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os produtos de PCR purificados foram digeridos com as endonucleases de restrição XhoI (Invitrogen) e HindIII (Invitrogen) e clonados nos sítios de restrição correspondentes no plasmídeo pACYC177 sob controle do promotor do gene de resistência à canamicina, gerando o plasmídeo pPAS3. Células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas por eletroporação (item 3.3.5) com este plasmídeo e os transformantes selecionados em placas de LBA contendo ampicilina (100 μ g/mL), após incubação a 37 °C por 18 h. Colônias resistentes foram testadas quanto à presença do gene *afpA* por PCR. Um transformante confirmado por PCR, foi denominado DH5 α (pPAS3). O sequenciamento de nucleotídeos também foi utilizado para confirmar a inserção correta e a ausência de mutação no gene *afpA*, conforme descrito no item 3.3.6.

O plasmídeo pPAS3 da cepa DH5 α (pPAS3) foi então extraído, transformado por eletroporação em células competentes da cepa mutante em *afpA* (item 3.3.5), e os clones transformantes selecionados, após incubação a 37 °C por 18 h, em LBA contendo ampicilina (100 μ g/mL). A cepa complementada foi confirmada para o gene *afpA*, por PCR, usando os oligonucleotídeos iniciadores de clonagem FwAfpAXhoI e RvAfpAHindIII (**Tabela 2**) e sequenciado como descrito no item 3.3.6.

3.19 Produção e adsorção de soro policlonal anti-AFP em coelhos

3.19.1 Produção do soro anti-UPEC-46

O protocolo de produção do soro anti-UPEC-46 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), registrado sob o N^o 9627230920, e realizado no Biotério de Experimentação do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Para a produção do soro, a cepa UPEC-46 foi cultivada em caldo LB a 37 °C por 18 h sem agitação. Em seguida, as células bacterianas foram concentradas por centrifugação a 700 x g por 10 min a 4 °C e ressuspensas com esterilidade em 2 mL de solução salina 0,85% com 0,5% de formaldeído, mantida a 4 °C. Antes do início do processo de

imunização, foram coletados aproximadamente 1 mL do sangue do coelho para a obtenção do soro pré-imune. Para as imunizações, o inóculo em solução salina/formaldeído foi ajustado para uma concentração bacteriana equivalente ao tubo 1 da escala de MacFarland ($\sim 3,0 \times 10^8$ UFC/mL) em solução salina. Essa suspensão foi inoculada por via endovenosa em coelho albino jovem (raça New Zealand), com aproximadamente 60 dias de idade. O esquema de imunização foi realizado de acordo com o descrito por Ewing (1986) e incluiu oito inoculações em volumes crescentes de 0,5 a 4 mL, em doses com intervalos de três dias entre as mesmas. A sangria total foi realizada após uma semana da última dose reforço. Logo após a coleta, o sangue obtido (antes e depois da imunização) foi mantido em estufa a 37 °C por 1 h. Após este período, o coágulo formado foi deslocado da parede do recipiente com palitos esterilizados, e a preparação mantida a 4 °C, por 18 h. A preparação foi então, submetida a centrifugação a 800 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante transferido e aliquoteado em tubos estéreis, sendo este nomeado como soro anti-UPEC-46.

3.19.2 Produção do soro anti-AFP após adsorção

Para adsorção do soro anti-UPEC-46, a cepa mutante em *afpA* foi cultivada em dez tubos contendo 3 mL de LB a 37 °C por 18 h, sem agitação. Em seguida, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 700 x g por 10 min e os sobrenadantes descartados. O sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 1X contendo 1 mM de *phenylmethylsulfonyl flouride* (PMSF; Sigma-Aldrich) e, então, novamente centrifugado a 700 x g por 10 min. Após esse procedimento, o sedimento foi ressuspensionado com aproximadamente 1 mL de soro anti-UPEC-46, incubado 1 h à temperatura ambiente e centrifugado a 700 x g por 10 min. O soro foi recuperado e reexposto às células da cepa mutante, e esse procedimento de adsorção foi repetido nove vezes. O soro adsorvido, denominado anti-AFP, foi esterilizado em membrana filtrante (20 µm) e armazenado a -20 °C.

3.19.3 Immunoblotting dos soros pré-imune e anti-AFP

Os soros pré-imune e anti-AFP foram analisados por *immunoblotting* contra as cepas UPEC-46 e UPEC-46 mutante em *afpA*. Primeiramente, as cepas selvagem e mutante foram cultivadas em 1 mL de a 37 °C por 18 h, sem agitação. Em seguida,

as células foram centrifugadas a 700 x g por 10 min e os sobrenadantes descartados. O sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de PBS 1X contendo o tampão de corrida na proporção 1:6, e submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE a 12% em condições desnaturantes (item 3.11). Os géis foram preparados em triplicata e a eletroforese realizada a 120 V por 1 h em tampão Tris-Glicina. Dos três géis preparados, dois continham o lisado de proteínas total das cepas UPEC-46 e mutante em *afpA* (para a análise com o soro anti-AFP) e um continha apenas o lisado de proteínas total da cepa UPEC-46 (para a análise com o soro pré-imune).

Para a análise da reatividade dos soros, os géis foram transferidos para membrana de nitrocelulose (Amersham) e transferência do conteúdo proteico para as membranas foi realizada com auxílio do sistema *Trans-Blot SD Semi-Dry* (BioRad), utilizando o tampão de transferência em corrente elétrica constante de 10 V por 40 min. As membranas resultantes foram incubadas a 4°C por 18 h na solução de bloqueio, contendo 5% de leite desnatado em PBS-Tw. Em seguida, elas foram lavadas três vezes com PBS-TW, à temperatura ambiente, sob agitação, por 5 min. Posteriormente, uma das membranas foi incubada com 20 mL de uma diluição 1:500 do soro pré-imune e a outra membrana incubada em 20 mL de uma diluição 1:500 do soro anti-AFP. Ambas as membranas foram incubadas em solução contendo 2,5% de leite desnatado e o anticorpo diluído em PBS-Tw. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 h, sob agitação, em temperatura ambiente e, posteriormente, lavadas três vezes com PBS-Tw. Após essa etapa, as membranas foram então incubadas com 20 mL de uma diluição 1:5.000 do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), em solução contendo 2,5% de leite desnatado e o anticorpo diluído em PBS-Tw por 1 h, sob agitação, em temperatura ambiente. As membranas foram reveladas pelo sistema de quimioluminescência ECL (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante.

Por fim, um dos géis resultantes foi corado utilizando o corante *Coomassie Brilliant Blue G250* (Merck), conforme previamente descrito (SAMBROCK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

3.19.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) com imunomarcação com o soro anti-Afp

As cepas UPEC-46, UPEC-46 mutante em *afpA* e mutante complementada foram cultivadas em 3 mL de LB por 18 h a 37 °C em condição estática, sendo em seguida centrifugadas a 1700 x g, 20 °C por 4 min. Os sedimentos foram ressuspensos em 500 µL de PBS 1X e lavados três vezes (centrifugações a 1.700 x g por 4 min) com a mesma solução. As preparações foram então fixadas com paraformaldeído 4% em PBS 1X por 30 min em temperatura ambiente. Após este período, as preparações foram lavadas três vezes com 500 µL de PBS 1X contendo BSA a 0,2% (PBS-BSA 0,2%) e bloqueadas com 500 µL da mesma solução por 30 minutos. Em seguida, as preparações foram incubadas com os anticorpos primários (anti-AFP e soro pré-imune) na diluição de 1:50 em PBS-BSA 0,2%, durante 24 h a 4 °C. Após a incubação, as preparações foram lavadas com PBS 1X e incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho produzido em cabra, marcado com partículas de ouro coloidal 10 nm [Sigma-Aldrich]) na concentração de 1:20 em PBS 1X, durante 4 horas a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS 1X as preparações foram centrifugadas a 1.700 x g por 4 min. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento ressuspensado em água. Imediatamente, 10 µL da suspensão bacteriana foi acrescida de 10 µL de acetato de uranila a 2% em água, e a mistura aplicada sobre grades de níquel (300 *mesh*) previamente revestidas com Formvar. Após 2 min, o excesso de líquido sobre a grade foi retirado com papel de filtro, e as preparações secas ao ar. As preparações foram observadas por MET (LEO 906E, Zeiss, Alemanha) a 80 kV do Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Butantan.

3.20 Ensaio de mutagênese com o *transposon EZ-Tn5*

3.20.1 Construção da biblioteca de mutantes

O kit “*EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome*” (Epicentre Technologies) foi empregado para a mutagênese da cepa UPEC-46, seguindo recomendações do fabricante. O *transposoma* consiste em um complexo estável formado pela enzima *transposase* e o *transposon EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2>*, que contém uma origem de replicação condicional R6Kγ, o gene de resistência a canamicina (*Tn903*) funcional em *E. coli* e é flanqueado por sequências de inserção invertidas de 19 pb.

Para a mutagenização da cepa UPEC-46, o *transposoma EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2>Tnp* células competentes da cepa UPEC-46 foram transformadas

por eletroporação (item 3.3.5). As células recuperadas foram semeadas em placas de LBA contendo canamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 18 h. Todos os mutantes obtidos foram mantidos a -80 °C em meio LB acrescido de 40% de glicerol até serem utilizados.

3.20.2 Análise fenotípica da biblioteca de mutantes

Os mutantes obtidos foram analisados por meio do teste de adesão qualitativa em células HeLa, conforme descrito no descrito no item 3.4.2, com algumas modificações. Inicialmente, as cepas bacterianas foram cultivadas em 1 mL de caldo LB a 37 °C por 18 h em cultura estática. As monocamadas de células HeLa dispostas em microplacas de cultura celular de 48 poços foram lavadas com PBS 1X. Após as lavagens, as células foram infectadas com 20 µL da cepa bacteriana em um volume final de 400 µL contendo o meio DMEM, suplementado com 2% de SFB e 1% de D-manose, e então, incubadas por 6 h a 37°C. Após o período de infecção, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS 1X, fixadas com metanol 70%, coradas segundo May-Grünwald e Giemsa e lavadas. As placas foram secas e analisadas por microscopia óptica invertida sob aumento de 400 vezes para a presença de mutantes negativos ao padrão de adesão agregativa produzido pela cepa UPEC-46.

Os mutantes negativos ao padrão agregativo obtidos nesta triagem inicial foram novamente analisados pelo teste qualitativo de adesão em microplacas de cultura celular de 24 poços com lamínulas, como descrito no item 3.4.2. Todos os testes foram realizados em duplicata e como controles foram utilizadas as cepas *E. coli* DH5α (não aderente) e UPEC-46 (cepa selvagem positiva ao padrão AA).

3.20.3 Mapeamento da transposição

Os mutantes negativos ao padrão AA foram submetidos a experimentos de clonagem e sequenciamento para a obtenção do local de inserção do *transposon* no genoma. Para isso, o DNA genômico destes mutantes foi extraído (item 3.3.1) e, após sua extração, digerido com endonucleases de restrição (Invitrogen) que não clivam a sequência do *transposon* (EcoRI, KpnI ou NdeI, Invitrogen). As reações de digestão foram realizadas seguindo recomendações dos fabricantes. Após a digestão, os fragmentos foram purificados, utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band*

Purification (GE Healthcare), e a determinação das concentrações do DNA digerido foram realizadas conforme descrito no item 3.3.3.

A reação de ligação dos fragmentos de DNA genômico foi realizada em um volume final de 10 µL, empregando-se 1 µg dos fragmentos purificados, 1 U de *T4 DNA Ligase* (Invitrogen), tampão da enzima 1X e água ultrapura esterilizada, seguido por incubação à 37 °C durante 45 min e inativação a 75 °C por mais 20 min. Os produtos de ligação foram então transformados por eletroporação em células competentes de *E. coli* DH5α (λ pir) (item 3.3.5) e as colônias obtidas após incubação a 37 °C por 18 h em placas de LBA suplementadas com canamicina (50 µg/mL).

O DNA plasmídial de cinco colônias para cada mutante negativo ao padrão agregativo, foi extraído e quantificado em espectrometria a 260 nm, conforme descrito nos itens 3.3.3 e 3.3.4. A região flanqueada do *transposon* nos mutantes, contendo o plasmídeo com a origem de replicação *R6K γ* , foi submetida a reação de sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos iniciadores KAN-2 FP-1 e R6KAN-2 RP-1 (**Tabela 2**), conforme descrito no item 3.3.6.

3.21 Mutação do gene *fimH* pelo sistema λ Red

A metodologia para a construção da cepa duplo mutante no gene *fimH* e *afpA* foi baseada na técnica de mutagênese sítio dirigida, empregando o sistema de recombinases codificadas pelo fago λ Red (DATSENKO; WANNER, 2000).

3.21.1 Obtenção do fragmento *fimH:clo*

Inicialmente, o fragmento contendo o cassete de resistência ao cloranfenicol (*fimH:clo*) foi amplificado por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FwRedFimH e RvRedFimH (**Tabela 2**), na qual cada um apresenta como característica uma região inicial de 80 nucleotídeos homóloga ao gene *fimH* e uma região final de 20 nucleotídeos utilizados para a amplificação do gene de resistência ao cloranfenicol, a partir do vetor pKD3 (**Tabela 1**).

A PCR foi realizada de acordo com o item 3.3.2, seguindo as seguintes condições: uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos (94 °C 30 seg, 50 °C 1 min e 72 °C 1 min e 45 seg), com uma extensão final de 72 °C por 7 min. Foram realizadas 20 reações e os produtos de PCR dessas reações foram

analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 3.3.3), e após a eletroforese, o fragmento de DNA obtido foi purificado utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante.

Em seguida o fragmento de DNA *fimH:clo* foi tratado com a endonuclease DpnI (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante, para eliminação de qualquer DNA genômico (metilado) remanescente. Em seguida, as digestões foram avaliadas por corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% (item 3.3.3), novamente purificadas utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e quantificadas.

3.21.2 Inserção dos genes que codificam as recombinases

Células competentes da cepa mutante em *afpA* foram transformadas por eletroporação (item 3.3.5) com o plasmídio pKOBEG-Apra (**Tabela 2**), que contém os genes que codificam as recombinases. Os transformantes foram recuperados em 1 mL de meio SOC a 30 °C por 1 h, com agitação de 250 rpm. Após a recuperação, 50 e 100 µL da suspensão bacteriana foram cultivados em placas de LBA, contendo o antibiótico apramicina (100 µg/mL) e incubadas a 30°C por 18 h. Algumas colônias transformadas com pKOBEG-Apra foram selecionadas e estocadas a -80 °C com 40% de glicerol.

3.21.3 Transformação fragmento *fimH:clo* e seleção das cepas recombinantes

Inicialmente, células competentes da cepa mutante em *afpA* contendo o plasmídio pKOBEG-Apra foram inoculadas em 100 mL de caldo LB contendo apramicina (100 µg/mL) e D-arabinose (Sigma-Aldrich) a 0,1 M. Em seguida a cultura foi incubada a 30 °C, sob agitação de 250 rpm, até atingir a DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,7. Em seguida, o preparo das cepas bacterianas competentes seguiu conforme descrito no item 3.3.5.

Diluições seriadas do fragmento linear *fimH:clo* (20, 50 e 100 ng) foram usadas na transformação por eletroporação (item 3.3.5) com células competentes da cepa mutante em *afpA* contendo o plasmídio pKOBEG-Apra e expressando as recombinases codificadas por esse plasmídio. Os clones recombinantes foram

selecionados em LBA contendo canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (20 µg/mL), e foram incubadas a 37 °C por 18 h.

Após a obtenção de clones recombinantes, esses foram submetidos a eliminação do plasmídeo pKOBEG-Apra por meio de sucessivos repiques dos candidatos a mutantes em duas placas de LBA, uma contendo cloranfenicol (25 µg/mL) e outra contendo apramicina (100 µg/mL), seguido por incubação a 42 °C por 18 h até a eliminação da resistência a apramicina.

3.21.4 Ensaio para a confirmação da mutação do gene *fimH*

Os transformantes selecionados foram avaliados inicialmente por testes bioquímicos para identificação da espécie *E. coli* (EPM, MILi e Citrato Simons) e da capacidade de fermentação da lactose, por meio do cultivo em ágar MC (item 3.2).

Em seguida, um transformante foi selecionado e submetido ao sequenciamento de nucleotídeos para a confirmação da inserção do fragmento *fimH:clo* no gene *fimH*. Para o sequenciamento, primeiramente foi realizada a extração do DNA genômico dessa cepa, conforme descrito no item 3.3.1. Uma PCR foi realizada para a amplificação da região *upstream* e *downstream* ao gene *fimH*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FimH-Fw e FimH-Rv (**Tabela 2**), conforme descrito no item 3.3.2. O seguinte ciclo de amplificação foi utilizado: uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min; 30 x (94°C/1 min; 56°C/1 min; 72°C/1 min) com uma extensão final de 72°C 7 min. As amplificações dos fragmentos das PCR foram avaliadas em gel de agarose 0,8% (item 3.3.3) e purificados do gel de agarose com auxílio do kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), para posterior sequenciamento de nucleotídeos, realizado conforme descrito no item 3.3.6.

3.22 Análises fenotípicas das cepas mutantes e complementadas

3.22.1 Curva de crescimento

Para obtenção da curva de crescimento das cepas bacterianas, inicialmente uma colônia isolada obtida em placa de ágar MC foi cultivada em 3 mL de caldo LB sob agitação de 225 rpm por 18 h a 37 °C. Posteriormente, 0,5 mL da cultura foi transferida para 49,5 mL de caldo LB, meio DMEM ou meio RPMI e a cultura foi mantida a 37°C

com agitação constante de 225 rpm. A cada 30 min uma alíquota de 1 mL da amostra foi retirada da cultura para a leitura de DO em 600 nm. Esse processo foi repetido até atingir o período de 6 h de cultivo. O presente teste foi realizado em triplicata biológica.

3.22.2 Ensaio de motilidade

As cepas foram cultivadas em 3 mL de LB a 37 °C por 18 h. Uma alíquota de 2 µL desses cultivos foi aplicada no centro de placas contendo meio semissólido (LB contendo 0,3% de ágar), as quais foram incubadas a 37 °C por 18 h, sendo a motilidade medida pelo espalhamento bacteriano em torno do inóculo inicial. A cepa bacteriana *Shigella flexneri* 2a foi utilizada como controle negativo de motilidade. O presente teste foi realizado em duplicata técnica e triplicata biológica.

3.22.3 Análise da expressão da fímbria tipo 1

A presença de fímbria tipo 1 foi avaliada indiretamente por meio da capacidade das bactérias aglutinarem uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* em tampão PBS 1X, conforme o protocolo descrito por Schembri et al. (2005), com algumas modificações.

Previamente, as cepas bacterianas foram cultivadas em LBA a 37 °C por 18 h, e as leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Kasvi), sob as mesmas condições. Após os cultivos iniciais, uma suspensão bacteriana e da levedura diluídas em 30µL de PBS 1X foram misturadas na superfície de uma lâmina de vidro e homogeneizado até o aparecimento de agregados visíveis a olho nu, indicando assim a presença da fímbria tipo 1 (resultado positivo).

Ensaio de inibição da aglutinação foram realizados da mesma maneira como descrito acima, onde as suspensões foram diluídas em 30 µL de 2% D-manose. Após homogeneização observou-se novamente a presença ou não de aglutinação. O presente teste foi realizado em duplicata e as cepas EAEC 17-2 e *E. coli* HB101, foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.23 Ensaio *in vivo* com a cepa UPEC-46 e construções derivadas

3.23.1 Modelo de colonização intestinal em camundongos tratados com o antibiótico estreptomicina

O modelo de colonização intestinal em camundongos tratados com estreptomicina foi adaptado conforme descrito por Harrington et al. (2009) e foi realizado para avaliar a capacidade de colonização intestinal da cepa UPEC-46, além do papel da adesina AFP e fímbria tipo 1. Este protocolo de experimentação foi aprovado pela CEUA-ICB/USP (Protocolo N° 9627230920) e realizado no Biotério de Experimentação NB-2 do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Resumidamente, grupos de dez camundongos fêmea BALB/c de seis a dez semanas de idade foram utilizados para cada cepa avaliada. Em cada grupo, nove camundongos foram inoculados com a respectiva cepa, sendo um destes reservado para as análises de microscopia eletrônica. Além disso, um camundongo de cada grupo foi inoculado com PBS 1X e utilizado como controle negativo nos ensaios de microscopia eletrônica. Esses camundongos foram adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e foram classificados como livres de patógenos específicos (*specific pathogen-free*, SPF). Todos os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno com filtro de ar e aclimatados por cinco dias até o início do experimento e foram classificados como livres quanto a presença nas fezes de bactérias resistentes à estreptomicina e cepas positivas para AFP, avaliadas por PCR (item 3.3.2 para amplificação do gene *afpB* [componente do *operon afp*]), utilizando os iniciadores 4534-Fw e 4534-Rw (**Tabela 2**).

Primeiramente, os animais foram tratados com água *ad libitum* contendo estreptomicina (5 g/L) 48 h antes da inoculação e durante todo o experimento. As seguintes cepas foram analisadas nesse modelo: UPEC-46 (cepa selvagem), UPEC-46::*afpA* (cepa mutante em *afpA*), UPEC-46::*afpA* (pPAS3) (cepa complementada em *afpA*) e UPEC-46::*afpA::fimH* (cepa duplo mutante em *afpA* e *fimH*). Para o preparo do inóculo, as cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em 3 mL de caldo LB contendo estreptomicina (100 µg/mL) a 37 °C por 18 h sem agitação. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 1.700 x g por 10 min e os sedimentos ressuspensos em 1 mL de PBS 1X, e diluídos em PBS 1X para uma concentração final de 5,0 x 10³ UFC/mL. Antes da inoculação das amostras, os camundongos receberam por via oral uma solução de bicarbonato de sódio 0,4 M para a neutralização do pH gástrico. Cerca de 15 min depois, 200 µL do inóculo bacteriano (1,0 x 10³ UFC) foram administrados

por via oral por meio de gavagem e as fezes dos animais foram coletadas diariamente até o 14^o dia pós-inoculação.

Durantes todos os dias de coleta, as fezes frescas foram pesadas, homogeneizadas em 1 mL de PBS 1X e diluições seriadas (de 10¹ até 10⁸) foram semeadas em placas de ágar MC contendo estreptomicina (100 µg/mL) ou outro antibiótico apropriado (de acordo com cepa avaliada). Os valores obtidos foram expressos em UFC/g de fezes. Durante os 14 dias de experimento, as colônias isoladas para cada animal das placas de ágar MC foram avaliadas por PCR para o gene *afpB*, específico para todas as cepas inoculadas, utilizando os iniciadores 4534-Fw e 4534-Rw (**Tabela 2**). As técnicas de PCR e eletroforese foram realizadas conforme descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3.

Após os 14 dias, os camundongos foram eutanasiados por meio da inoculação de uma associação de 300 mg/kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina administradas intraperitonealmente. Um dos animais de cada grupo mais o animal inoculado com PBS 1X (controle negativo) foram abertos e secções de 0,5 cm de cada compartimento (duodeno, jejuno, íleo e cólon) foram retiradas para análise por microscopia eletrônica, sendo os cortes fixados em uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por um período de pelo menos 48 horas.

3.2.3.2 Modelo murino de infecção ascendente do trato urinário

O modelo murino de infecção ascendente do trato urinário foi adaptado das metodologias descritas por Boll et al. (2013) e Hvidberg et al. (2000). Esse experimento foi realizado para avaliar a capacidade de colonização de órgãos do trato urinário (bexiga e rins) da cepa UPEC-46 e construções na adesina AFP e fímbria tipo 1. Este protocolo de experimentação foi aprovado pela CEUA-ICB/USP (Protocolo N° 2172190318) e realizado no Biotério de Experimentação NB-2 do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Para o experimento, grupos de dez camundongos fêmea C57BL/6 de seis a dez semanas de idade foram utilizados para cada cepa a ser avaliada. Em cada grupo, nove camundongos foram inoculados com a respectiva cepa, sendo um destes reservado para as análises de microscopia eletrônica. Além disso, um camundongo de cada grupo foi inoculado com PBS 1X e utilizado como controle negativo nos ensaios de microscopia eletrônica. Esses camundongos foram adquiridos junto ao

Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e foram classificados como livres de patógenos específicos (*specific pathogen-free*, SPF). Todos os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno com filtro de ar e aclimatados por cinco dias até o início do experimento.

As seguintes cepas foram analisadas nesse modelo: UPEC-46 (cepa selvagem), UPEC-46::*afpA* (cepa mutante em *afpA*), UPEC-46::*afpA* (pPAS3) (cepa complementada em *afpA*) e UPEC-46::*afpA::fimH* (cepa duplo mutante em *afpA* e *fimH*). Para o preparo do inóculo, as cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em LBA a 37 °C por 18 h. Posteriormente, as culturas foram ressuspensas em 3 mL de solução salina 0,85% e ajustadas visualmente de acordo com a escala 7 de McFarland (~2,0 x 10⁹ UFC/mL). Um volume de 1,5 mL (3,0 x 10⁹ UFC) dessa suspensão bacteriana foi centrifugada a 1.700 x g por 10 min e o sedimento foi ressuspensado em 150 µL (3,0 x 10⁹ UFC) de solução salina 0,85%.

Para a inoculação, os animais foram inicialmente sedados com uma associação de 100 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina administrada intraperitonealmente. Após sedação, foi realizada a antisepsia da região perianal e genital com gaze esterilizada e álcool 70% e um cateter intravenoso ETFE (etileno-tetrafluoretileno), tamanho 24 G x 3/4" (Nipro Safelet) foi introduzido na uretra dos animais de forma a atingir a entrada da bexiga. Devido ao volume residual do canhão do cateter ser de 100 µL, foram injetados em cada animal com o auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL (Descarpack, Brasil), 50 µL (1,0 x 10⁹ UFC) do inóculo previamente preparado. Após a inoculação e retirada lenta do cateter os animais foram observados até a finalização da anestesia.

Os camundongos foram sacrificados 72 h após a inoculação com uma associação de 300 mg/kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina administradas intraperitonealmente. Em seguida os rins e bexiga de cada animal foram coletados, pesados e acondicionados em 1 mL de solução salina 0,85%. Os órgãos foram mantidos em gelo até a homogeneização com auxílio do disruptor de tecidos Omni Mixer (OMNI-TH), com auxílio da sonda média funcionando no ciclo baixo durante 15 seg. Posteriormente, diluições seriadas (de 10¹ até 10⁸) desses órgãos foram semeados em placas de ágar MC contendo o antibiótico apropriado de acordo com cepa avaliada. Em paralelo as suspensões de tecidos foram também semeadas em LBA para confirmação de que não havia contaminantes de outras espécies. As placas de ágar MC e LBA foram incubadas a 37 °C durante 18 h. Os valores obtidos nas

placas de ágar MC foram expressos em UFC/g de órgão. Por fim, colônias isoladas para cada animal das placas de ágar MC foram avaliadas por PCR para o gene *afpB* específico em toda cepa inoculada, utilizando os iniciadores 4534-Fw e 4534-Rv (**Tabela 2**). As técnicas de PCR e eletroforese foram realizadas conforme descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3.

Um dos animais de cada grupo mais o animal inoculado com PBS 1X (controle negativo) foram utilizados para análises por microscopia eletrônica, sendo os órgãos (bexiga e rins) coletados e fixados em uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por um período de pelo menos 48 horas.

3.23.3 Análises por microscopia eletrônica

Fragmentos de intestino, obtidos nos ensaios de colonização intestinal em camundongos tratados com estreptomicina (item 3.23.1), além dos órgãos do trato urinário (bexiga e rins), coletados dos animais após realização dos ensaios de ITU em modelo murino (item 3.23.2), foram utilizados para as análises de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, conforme descrito abaixo.

3.23.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para esse ensaio, os fragmentos dos órgãos coletados foram primeiramente fixados em glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por um período de pelo menos 48 horas. Após o período de fixação, os fragmentos foram lavados três vezes com solução tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por 30 min à temperatura ambiente, pós-fixados durante 1 h com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, e lavados por mais três vezes com a solução tampão. Em seguida, as preparações foram desidratadas em gradiente crescente de concentração de etanol (50%, 75%, 85%, 95% e 100% - 30 min em cada solução). Após a finalização do processo de desidratação pelo método de ponto crítico do gás carbônico (aparelho de ponto crítico - mod. CPD030, Leica, Alemanha), as preparações foram montadas em um suporte apropriado para o microscópio de varredura (*stubs*), receberam uma fina camada de ouro (metalizador mod. SCD050, Leica), e foram observadas em MEV (mod. Quanta 250, FEI Company, Holanda), operando em 12,5 kV e distância de trabalho 6 mm, no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Butantan.

3.23.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a MET os fragmentos dos órgãos coletados foram primeiramente fixados, pós-fixados e desidratados como descrito anteriormente (item 3.23.3.1). Após passagem por etanol 100% na etapa de desidratação, os fragmentos foram subsequentemente tratados com óxido de propileno 100% (2 x 30 min) para a finalização deste processo. As preparações foram então infiltradas em concentrações crescentes de resina Araldite (1:2 em óxido de propileno por 4 h e 1:1 por 16 a 18 h) e finalmente emblocadas em resina 100% em moldes de silicone. Nesta etapa, as preparações foram mantidas a 60 °C, durante 24 a 48 h, para polimerização. Cortes ultrafinos foram depositados sobre telas de cobre para microscopia eletrônica, previamente recobertas por uma película de Formvar, e as preparações submetidas à contrastação eletrônica com acetato de uranila aquosa a 2% e citrato de chumbo. Após este procedimento, as preparações foram analisadas no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Butantan, em MET (LEO 906E, Zeiss), operando a 60 kV.

3.24 Análises estatísticas

Para as diferentes análises estatísticas e preparação das representações gráficas foi utilizado o software *GraphPad Prism v. 6.0* (GraphPad, EUA). O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado nas análises de comparação entre a cepa selvagem (UPEC-46) e construções nos modelos animais avaliados. Nos demais resultados analisados, utilizou-se o teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou o teste de comparações múltiplas de Dunnett para comparar os resultados obtidos nesses experimentos. Valores de $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) e $P < 0,0001$ (****) foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Características fenotípicas da cepa UPEC-46

4.1.1 *Análise da adesão e capacidade de invasão nas linhagens celulares HeLa, HT-29 e 5637*

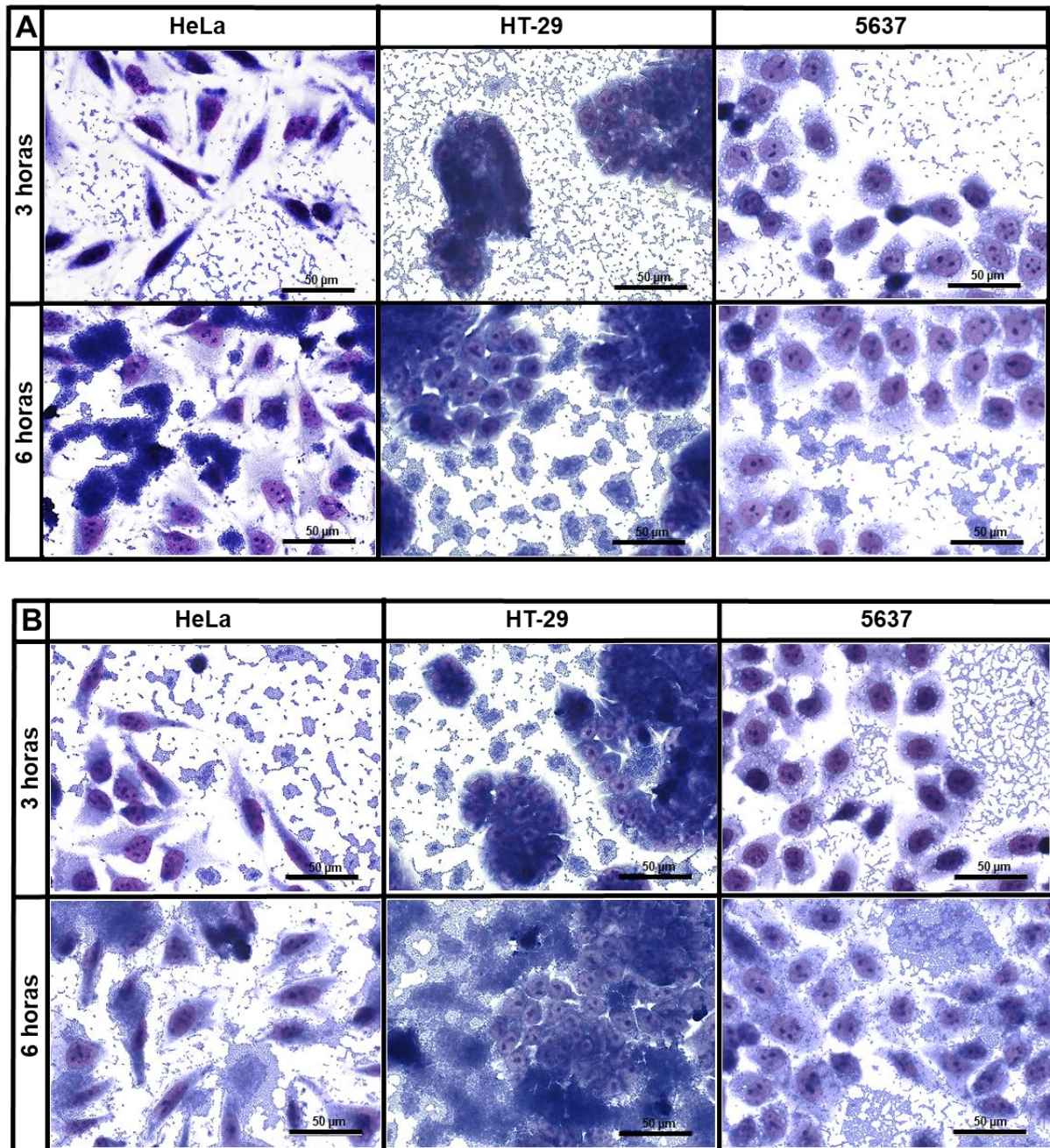
Nesta parte do estudo, foram realizados diferentes testes fenotípicos para caracterizar a cepa UPEC-46. Primeiramente, foi avaliada a capacidade dessa cepa em aderir e o padrão de adesão nas linhagens de células eucarióticas HeLa, HT-29 e 5637, utilizando o ensaio de aderência qualitativa em períodos de infecção 3 ou 6 h.

Para as células HeLa, a presença de bactérias aderidas de forma agregativa foi observada em ambos os tempos de infecção e na presença e ausência de 1% D-manose, a qual inibe a aderência mediada pela fímbria tipo 1. A cepa UPEC-46 aderiu no padrão AA típico tanto à lamínula como nas células epiteliais, sendo observado uma maior quantidade de bactérias aderidas no ensaio de 6 h de infecção e na ausência de manose, mostrando assim a importância da fímbria tipo 1 na adesão desta cepa (**Figura 6A**).

Além da linhagem de células HeLa, a capacidade de aderência da cepa UPEC-46 foi analisada na linhagem epitelial intestinal (HT-29). Para essa linhagem celular também foi observada a presença do padrão AA nos períodos de infecção de 3 e 6 h, e na presença e ausência de 1% D-manose. A quantidade de bactérias aderidas foi visualmente superior no período de 6 h de infecção e na ausência de D-manose (**Figura 6B**).

Por fim, como a cepa UPEC-46 foi isolada de um paciente apresentando ITU sintomática, a capacidade de adesão na linhagem de células epiteliais de bexiga 5637 também foi avaliada. Assim como observado nas linhagens anteriores, o padrão AA foi detectado após 3 h de interação e a capacidade de adesão foi superior no período de 6 h de infecção e na ausência de D-manose (**Figura 6C**).

Figura 6 – Padrão de adesão da cepa UPEC-46 em células epiteliais cultivadas

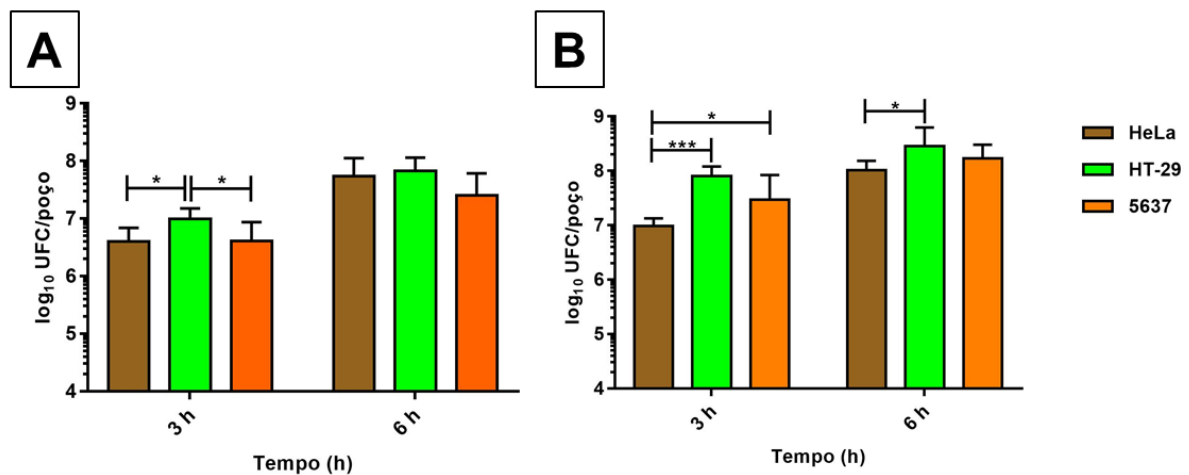


As células HeLa, HT-29 e 5637 foram infectadas com a cepa UPEC-46 (MOI=100) por períodos de 3 ou 6 h de interação bactéria-células, na presença **(A)** ou ausência **(B)** de 1% D-manose. Após o período de infecção, as células foram fixadas com Metanol 70%, coradas com as soluções corante May-Grünwald/Giemsa e observadas em microscópio óptico comum. Barras= 50 µm.

Conforme apresentado na **Figura 7**, os índices de adesão quantitativos foram maiores em todas as linhagens na ausência de de D-manose, confirmando as análises qualitativas **(Figura 6)**. Ao se comparar a capacidade de adesão da cepa UPEC-46 entre as diversas linhagens celulares, nota-se que o número de bactérias que aderiram às células intestinais HT-29 no período de 3 h de infecção foi

significativamente superior quando comparado às células HeLa ($P<0,05$). No período de 6 h, apenas na ausência de D-manose foi observado uma diferença significativa entre as linhagens HeLa e HT-29 ($P<0,05$) (**Figura 7**).

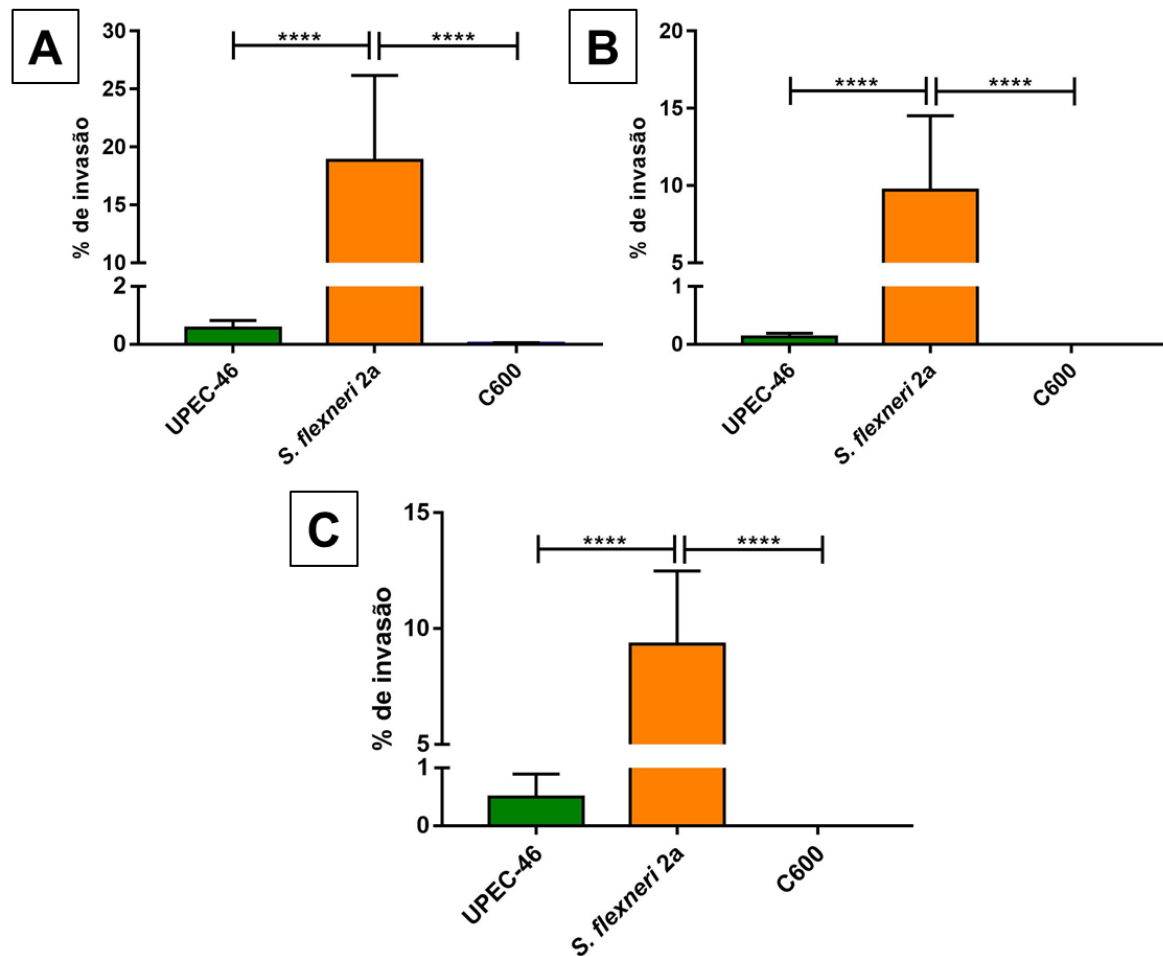
Figura 7 – Quantificação da adesão da cepa UPEC-46 em células epiteliais cultivadas



Os ensaios quantitativos de adesão para a cepa UPEC-46 foram realizados em períodos de infecção de 3 ou 6 h, utilizando diferentes linhagens de células eucarióticas (HeLa, HT-29 e 5637), na presença **(A)** ou ausência **(B)** de 1% D-manose. Inicialmente, as células foram infectadas com uma MOI de 100 e, após o período de infecção e lise com Triton-X-100 diluído a 1% em PBS 1X, a quantificação da adesão ocorreu em placas de ágar MC para a contagem de UFC. Os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica. Os dados apresentados consistem na média \pm desvio padrão, sendo estes expressos no gráfico em \log_{10} UFC/poço. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os resultados obtidos nesse experimento (*, $P<0,05$; ***, $P<0,001$).

A capacidade da cepa UPEC-46 de invadir células epiteliais também foi analisada nas mesmas linhagens celulares usadas nos ensaios de adesão, na ausência de D-manose durante 3 h de infecção. Apesar de contagens bacterianas terem sido obtidas após o tratamento com gentamicina, os índices de invasão observados foram de 0,56%, 0,13% e 0,5%, para as células HeLa, HT-29 e 5637, respectivamente. Esses índices foram significativamente inferiores quando comparados com a cepa invasiva *S. flexneri* 2a, usada como controle positivo ($P<0,0001$) (**Figura 8**).

Figura 8 – Quantificação de invasão da cepa UPEC-46 em células epiteliais cultivadas



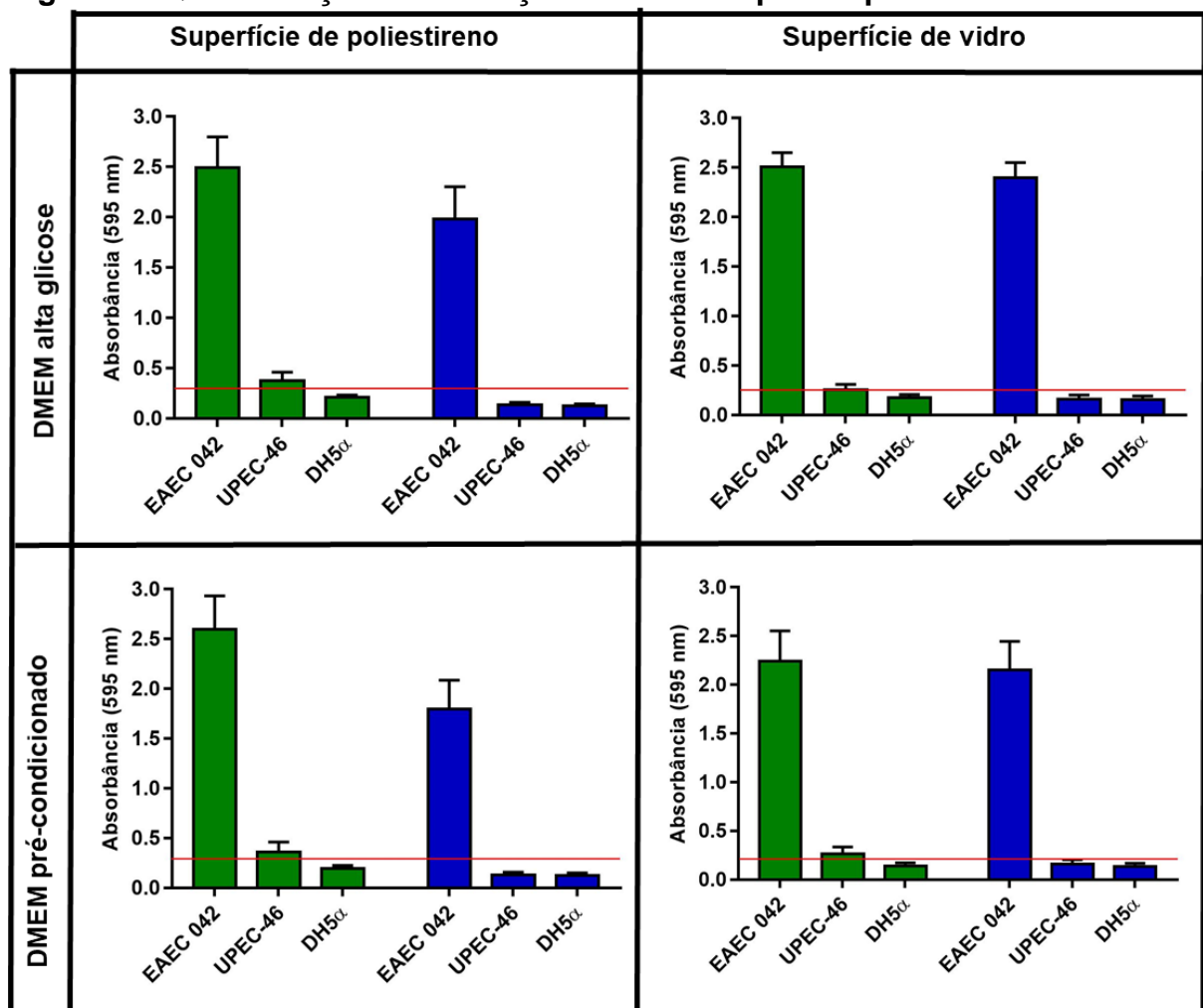
Os ensaios quantitativos de invasão para a cepa UPEC-46 foram realizados em períodos de infecção de 3 h, utilizando as linhagens de células eucarióticas **(A)** HeLa, **(B)** HT-29 e **(C)** 5637, na ausência de D-manose. As células foram inicialmente infectadas com uma MOI de 100 por um período de 3 h e em seguida tratadas com gentamicina por 1 h. Posteriormente, as células foram lisadas com Triton-X-100 diluído a 1% em PBS 1X e a quantificação do número de bactérias internalizadas ocorreu em placas de ágar MC. O índice de invasão foi obtido analisando o número total de bactérias associadas, obtido por meio do ensaio quantitativo de adesão, e o número de bactérias internalizadas, obtidas após o tratamento com gentamicina, utilizando o seguinte cálculo: número de bactérias internalizadas x 100 / número total de bactérias associadas. A cepa *S. flexneri* 2a foi utilizada como controle positivo de invasão e a cepa *E. coli* C600 foi utilizada como um controle não invasivo. Os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica. Os dados apresentados consistem na média \pm desvio padrão. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os resultados obtidos nesse experimento (****, $P < 0,0001$).

4.1.2 Capacidade de formação de biofilme

A capacidade de formação de biofilme pela cepa UPEC-46 foi avaliada por meio do cultivo em diferentes superfícies (poliestireno ou vidro) e meios de cultura

(DMEM alta glicose ou DMEM pré-condicionado), na presença ou ausência do análogo à manose (1% α -D-man). Analisando os resultados obtidos na ausência do α -D-man, a cepa UPEC-46 não foi capaz de formar biofilme, sendo que este resultado não diferiu entre as diferentes condições analisadas. Tanto na presença quanto na ausência do α -D-man os valores de DO_{595} obtidos foram acentuadamente inferiores quando comparados ao controle positivo (EAEC 042). Os resultados da formação de biofilme citados acima estão apresentados na **Figura 9**.

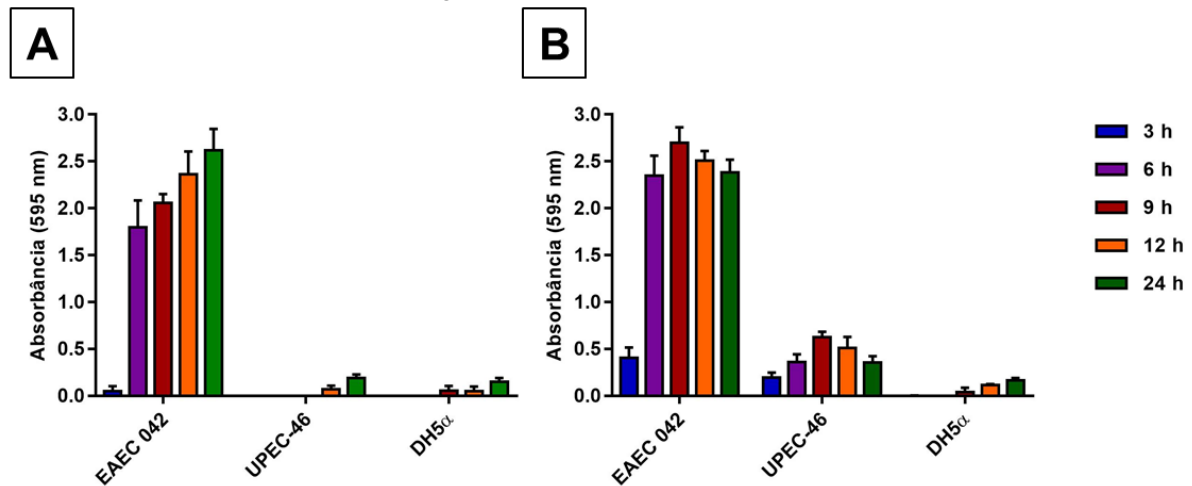
Figura 9 - Quantificação da formação de biofilme pela cepa UPEC-46



As cepas UPEC-46, EAEC 042 (controle positivo) e *E. coli* DH5 α (controle negativo) foram analisadas em diferentes superfícies abióticas (poliestireno ou vidro) e sob diferentes condições de cultivo (DMEM alta glicose ou DMEM pré-condicionado) por 24 h a 37 °C. As colunas representam a média \pm desvio padrão das triplicatas técnicas e triplicatas biológicas. As colunas verdes representam os valores de DO_{595} obtidos na ausência de α -D-man e as colunas azuis os valores obtidos na presença de 1% α -D-man. A linha vermelha representa o ponto de corte utilizado para estabelecer amostras formadoras e não formadoras de biofilme conforme proposto por Stepanović et al. (2007). O ponto de corte foi definido como valor da média mais três vezes o desvio padrão dos valores de DO_{595} obtidos para a cepa utilizada como controle negativo controle negativo (*E. coli* DH5 α).

Para compreender melhor a cinética da formação de biofilme, foram realizados ensaios avaliando diferentes tempos de infecção (3, 6, 9, 12 e 24 h) na presença ou ausência do α -D-man. Na presença de 1% α -D-man foram observados valores baixos de DO_{595} para a cepa UPEC-46 durante as 24 h de incubação. Esses valores foram similares aos observados no controle negativo (*E. coli* DH5 α) (**Figura 10A**). Na ausência do α -D-man ocorreu um aumento progressivo nos valores de DO_{595} para a cepa UPEC-46, até atingir o valor máximo no período de 9 h (Média da DO_{595} = 0,625). A partir deste momento, os valores de DO_{595} decaíram a valores próximos aos observados no controle negativo (*E. coli* DH5 α) (**Figura 10B**). Estes dados enfatizam que a formação de biofilme pela UPEC-46 na ausência do α -D-man é provavelmente dependente da ação da fímbria tipo 1. Assim, os resultados obtidos na cinética se somam com o observado na **Figura 9**, demonstrando que a cepa UPEC-46 é incapaz de estabelecer um biofilme intenso e duradouro nas diferentes condições avaliadas.

Figura 10 - Cinética da formação de biofilme



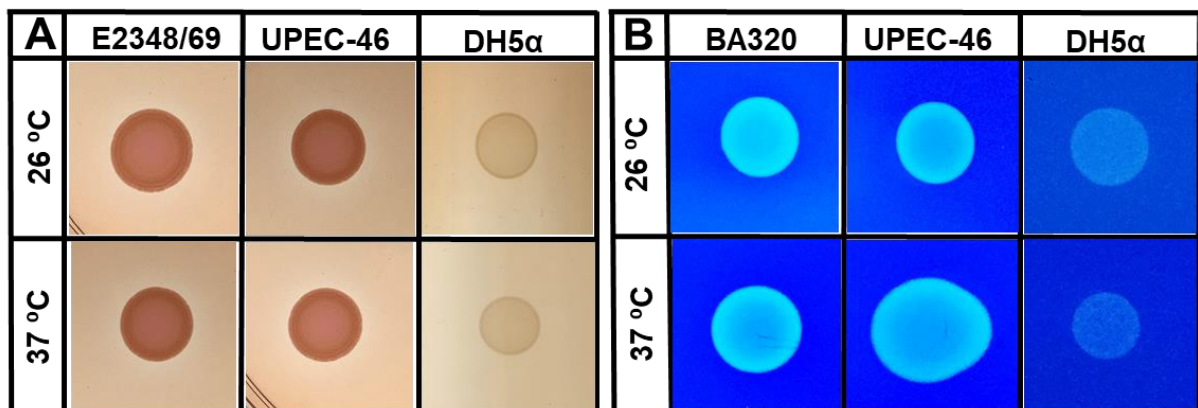
Para a análise da cinética da formação de biofilme as cepas UPEC-46, EAEC 042 (controle positivo) e *E. coli* DH5 α (controle negativo) foram cultivadas em superfície de poliestireno a 37 °C contendo o meio DMEM alta glicose durante diferentes períodos de incubação (3, 6, 9, 12 e 24 h). As colunas representam a média \pm desvio padrão das triplicatas técnicas e triplicatas biológicas. **(A)** cepas cultivadas na presença de 1% α -D-man; **(B)** cepas cultivadas na ausência de α -D-man.

4.1.3 Análise da expressão da fímbria curli e produção de celulose

A análise da expressão da fímbria curli foi realizada por meio do cultivo das cepas E2348/69 (controle positivo), *E. coli* DH5 α (controle negativo) e UPEC-46 em ágar vermelho Congo. Nesse meio de cultivo a cepa UPEC-46 apresentou colônias avermelhadas quando analisada a 26 °C e a 37 °C (**Figura 11A**), indicando assim a expressão de fímbria curli para essa cepa.

Além do curli, a produção da celulose foi avaliada por meio do cultivo das cepas em LBA contendo calcofluor. Para isso, foram utilizadas as cepas BA320 (controle positivo), *E. coli* DH5 α (controle negativo) e UPEC-46. Nesse ensaio fenotípico, pôde-se observar que a cepa UPEC-46 apresentou colônias fluorescentes quando analisada a 26 °C e a 37 °C (**Figura 11B**), indicando assim a expressão da celulose para essa cepa.

Figura 11 - Análise da expressão da fímbria curli e produção de celulose pela cepa UPEC-46



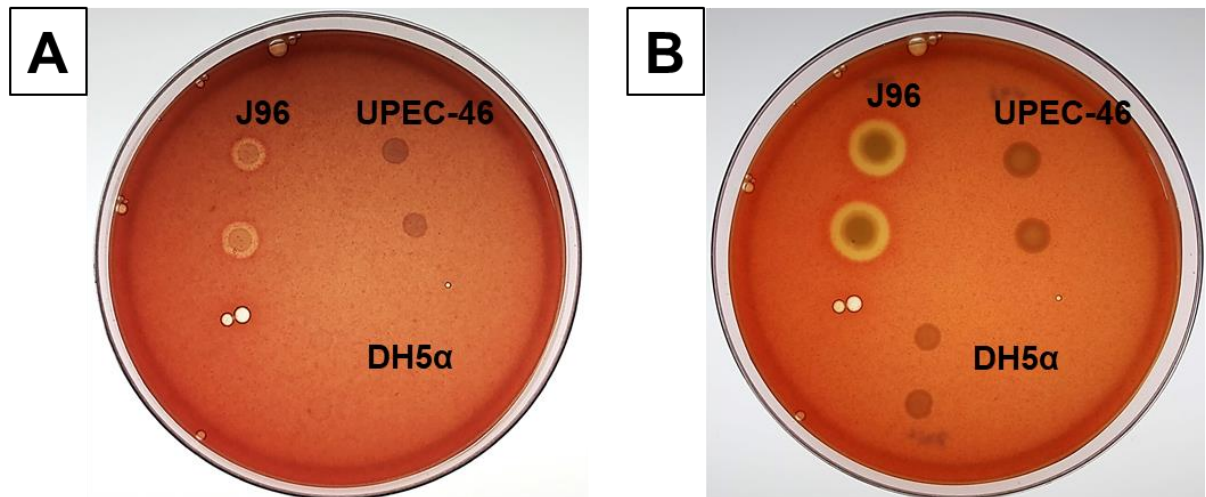
(A) A produção da fímbria curli foi verificada por meio do cultivo das cepas bacterianas em ágar vermelho Congo durante 48 h a 26 °C ou 24 h a 37 °C. A presença de colônias avermelhadas indicou positividade a expressão de curli, enquanto colônias brancas indicou negatividade. As cepas E2348/69 e *E. coli* DH5 α foram utilizadas como controle positivo e controle negativo, respectivamente. **(B)** A produção de celulose foi verificada por meio do cultivo das cepas bacterianas em LBA contendo calcofluor durante 48 h a 26 °C ou 24 h a 37 °C. A presença de colônias fluorescentes, após análise no transiluminador de luz ultravioleta UVP a 366 nm, indicou positividade a produção de celulose. As cepas BA320 e *E. coli* DH5 α foram utilizadas como controle positivo e controle negativo, respectivamente.

4.1.4 Produção de hemolisinas

A cepa UPEC-46 foi analisada quanto à produção de hemolisinas pelo cultivo em placa de ágar sangue contendo cloreto de cálcio. Foi observado para essa cepa ausência de hemólise em ambos os tempos avaliados (3 h e 24 h), indicando a ausência de produção de α -hemolisina e outras hemolisinas, tal como a

enterohemolisina (**Figura 12**). A presença de um halo hemolítico, resultado da completa lise dos enterócitos, foi observado apenas para a cepa J96 (controle positivo para α -hemolisina) após 3 h de incubação a 37 °C.

Figura 12 - Análise da produção de hemolisinas pela cepa UPEC-46

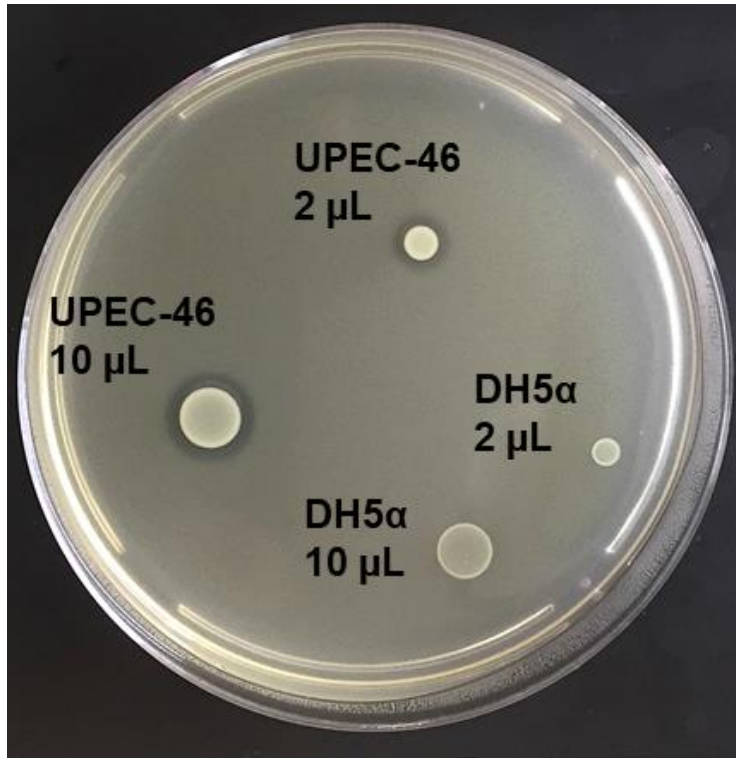


O ensaio de produção de hemolisinas para a cepa UPEC-46 foi realizado utilizando ágar sangue de carneiro contendo cloreto de cálcio. Após o cultivo, as cepas bacterianas foram incubadas a 37 °C e avaliadas após **(A)** 3 h e **(B)** 24 h. A cepa J96 foi utilizada como controle positivo para a produção α -hemolisina e a cepa *E. coli* DH5 α foi utilizada como controle negativo.

4.1.5 Produção de bacteriocinas

A cepa UPEC-46 foi também analisada quanto à produção de bacteriocinas pelo cultivo em LBA contendo a cepa indicadora *E. coli* C600. A secreção de bacteriocinas foi observado para a UPEC-46, na qual um halo de inibição de crescimento pode ser observado ao redor das colônias resultantes do cultivo de 10 e 2 μ L dessa cepa. Este mesmo halo não foi observado quando a cepa *E. coli* DH5 α , utilizada como controle negativo, foi testada (**Figura 13**).

Figura 13 - Análise da produção de bacteriocinas pela cepa UPEC-46

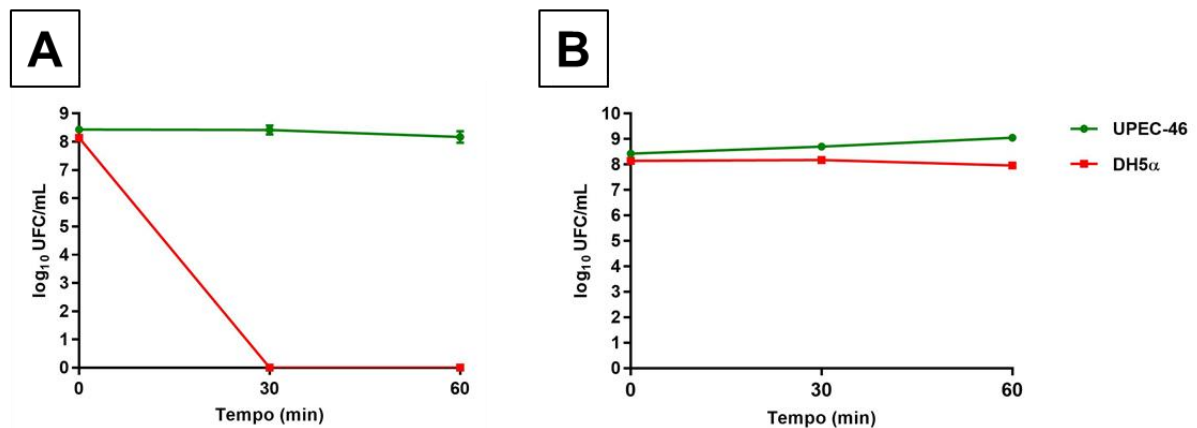


O ensaio de produção de bacteriocinas para a cepa UPEC-46 foi realizado utilizando o meio LBA contendo a cepa indicadora *E. coli* C600. Sobre o meio foram aplicados 10 ou 2 µL das cepas bacterianas a serem avaliadas e a placa foi incubada a 37 °C por 18 h. A produção de bacteriocinas foi evidenciada pela presença de um halo de inibição de crescimento da cepa indicadora ao redor da colônia produtora. A *E. coli* DH5α foi utilizada como cepa controle não produtora de bacteriocinas no ensaio realizado.

4.1.6 Resistência à ação bactericida do soro humano normal

A cepa UPEC-46 foi capaz de resistir à ação bactericida do sistema complemento, utilizando para isso soro humano normal. Foi observada uma alta taxa de sobrevivência bacteriana (acima de 80%) após 60 min de incubação. A cepa *E. coli* DH5α, utilizada como controle de susceptibilidade, não foi capaz de resistir ao contato com o soro humano, sendo observado ausência de contagem bacteriana nos primeiros 30 min de incubação (**Figura 14A**). Para validar se a sobrevivência da cepa UPEC-46 era relacionada à resistência da atividade do sistema complemento, os ensaios foram repetidos na presença de soro humano inativado. Nesta condição, a cepa *E. coli* DH5α foi capaz de sobreviver ao soro humano em ambos os tempos avaliados (30 e 60 min) (**Figura 14B**).

Figura 14 - Ensaio de resistência à ação bactericida do soro pela cepa UPEC-46

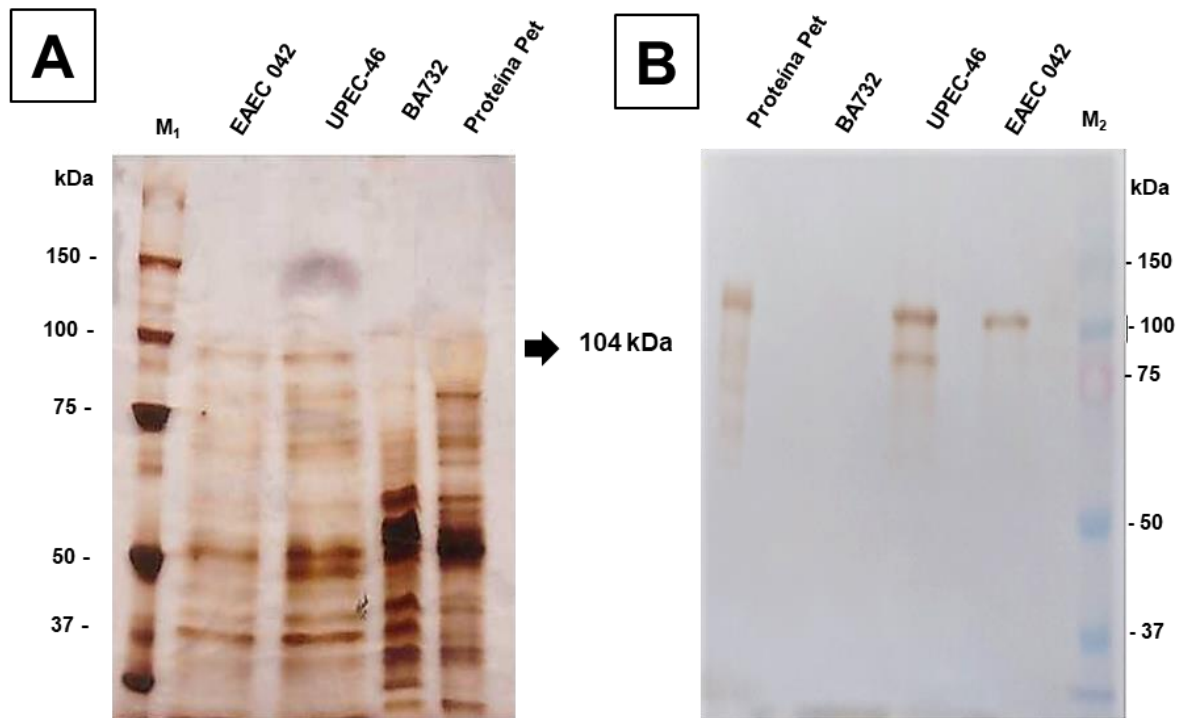


O ensaio foi realizado usando soro humano comercial diluído a 50%, por até 60 min de incubação a 37 °C. A cepa UPEC-46 foi avaliada quanto à resistência da ação bactericida do soro e a cepa *E. coli* DH5α foi utilizada como controle de susceptibilidade. Os dados representam a média ± desvio padrão das triplicatas biológicas. As seguintes condições foram avaliadas: **(A)** soro humano normal; **(B)** soro humano inativado pelo calor a 50 °C por 30 min.

4.1.7 Análise da produção da toxina Pet

A produção da proteína Pet em sobrenadante de cultura foi verificada por meio de imunodeteção com um soro anti-Pet específico. Conforme observado na **Figura 15**, houve a detecção de uma proteína de mesma massa molecular da proteína Pet (104 kDa) nos precipitados de sobrenadantes de culturas das cepas EAEC 042 (controle positivo) e UPEC-46, bem como na proteína Pet purificada. O mesmo não ocorreu no sobrenadante de cultura de cepa EAEC BA732 (controle negativo). Assim, os resultados obtidos pela imunodeteção com anti-Pet demonstram que a cepa UPEC-46 produz Pet *in vitro*.

Figura 15 - Imunodeteccção da proteína Pet a partir do sobrenadante de cultura bacteriana da cepa UPEC-46



Análise dos sobrenadantes concentrados de cultura das cepas UPEC-46, 042 (controle positivo), BA732 (controle negativo), bem como a proteína purificada Pet. **(A)** Análise em SDS-PAGE (12%) após coloração com prata. A seta corresponde ao peso molecular da proteína Pet (104 kDa). M₁ – marcador de massa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad). **(B)** Imunodeteccção da proteína Pet. Após corrida em gel SDS-PAGE (12%), o conteúdo foi transferido para uma membrana de nitrocelulose pela técnica de *Western Blotting* e a imunodeteccção foi realizada utilizando o anticorpo primário anti-Pet (1:1.000) e secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:5.000), seguido da revelação com a solução de 3-3'-Diaminobenzidina. M₂ – marcador de massa molecular *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad).

4.2 Características genótípicas da cepa UPEC-46

4.2.1 Sequenciamento e pesquisa de fatores de virulência

Nesta etapa do estudo foram realizadas as análises de sequenciamento, montagem e anotação do genoma da cepa UPEC-46. Com auxílio do software *Unicycler* foram gerados 23 *contigs* (≥ 500 pb), com um conteúdo genômico total de 5.087.484 pb e conteúdo GC de 50,65%. Além disso, dos 23 *contigs* identificados três foram classificados como plasmídios apresentando diferentes tamanhos: 135.351; 108.910 e 9.161 bp.

Nas diferentes análises *in silico* realizadas, genes de resistência à tetraciclina (*tet(B)*), sulfazotrim (*sul2* e *dfrA1*) e estreptomicina (*aadA1*) foram identificados pelo programa *ResFinder*. A sorotipagem *in silico* foi realizada por meio do programa *SerotypeFinder*, onde as sequências dos genes *wzx* e *wzy* foram atribuídas ao sorogrupo O166 e o gene *fliC* foi atribuído ao sorogrupo H12. Portanto, a cepa UPEC-46 pertence ao sorotipo O166:H12. Além disso, duas diferentes sequências de origem de replicação plasmidial foram encontradas na cepa UPEC-46 usando o programa *PlasmidFinder*. IncFII e IncB/O/K/Z, presentes nos plasmídios de 135.351 e 108.910 pb, respectivamente. Por fim, utilizando o programa *Prokka* para anotação, foram identificados 4.807 CDS, 4.902 genes e 94 RNA_t (RNA transportador). As características gerais do genoma da UPEC-46 estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Principais características do genoma da cepa UPEC-46

Características avaliadas	Cepa UPEC-46
Tamanho do genoma (pb)	5.087.484
Número de <i>contigs</i>	23
Conteúdo G+C (%)	50,65
N50	3.623.175
L50	1
Tamanho do plasmídio p46-1 (pb)	135.351
Tamanho do plasmídio p46-2 (pb)	108.910
Tamanho do plasmídio p46-3 (pb)	9.161
Perfil de resistência	<i>aadA1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i> e <i>tet(B)</i>
Sorotipo	O166:H12
Origens de replicação plasmidial	IncFII e IncB/O/K/Z
CDSs	4.807
Genes	4.902
RNA _t	94

Resultados obtidos pelo sequenciamento do genoma completo utilizando as plataformas *HiSeq 1500® System* e *MinION*. Os diferentes parâmetros de qualidade genômica (tamanho do genoma, número de *contigs*, conteúdo G+C, N50 e L50) foram obtidos pelas análises utilizando o programa *Quast*. O perfil de resistência foi obtido com o auxílio do software *ResFinder*, o sorotipo por meio do programa *SerotypeFinder* e as origens de replicação plasmidial pelo programa *PlasmidFinder*. Os números de CDSs, genes e RNA_t foram obtidos após a montagem do genoma com o programa *Prokka*.

N50 = tamanho em pb na qual os *contigs* com este ou maior tamanho incluem metade do total de bases; L50 = número de *contigs* que são maiores ou iguais ao tamanho N50.

A partir do sequenciamento e anotação do genoma da cepa UPEC-46, diferentes fatores de virulência foram identificados pelo banco de dados *ecoli VF collection*. Todos os fatores de virulência reportados por meio desse banco de dados foram manualmente confirmados pela ferramenta *BLAST* para garantir maior precisão dos resultados. Assim, alguns genes de EAEC (*aatA*, *aap*, *pet* e *astA*) identificados

por Abe et al. (2008) foram confirmados por meio dessa análise, ao passo que novos fatores de virulência associados a adesinas, invasinas, sistemas de captação de ferro, bacteriocinas, toxinas, resistência sérica e sistemas de secreção também foram detectados. Uma análise mais detalhada de todos os fatores de virulência presentes na cepa UPEC-46 está presente no **Apêndice D**.

Analisando alguns grupos específicos de genes, observou-se a cepa UPEC-46 apresentou algumas deleções em genes do sistema ETT2 (*E. coli type three secretion system 2*) e em genes da ilha de patogenicidade *aai*. Além disso, embora negativa ao critério proposto por Spurbeck et al. (2012), devido a positividade apenas para os genes *fyuA* e *yfcV*, e ao critério proposto por Johnson et al. (2003), devido a negatividade aos genes *papA/papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* e *kpsMTII*, a cepa UPEC-46 apresentou fatores de virulência comumente presentes em cepas ExPEC, tais como invasinas, fatores associados a sistemas de captação de ferro, bacteriocina e resistência sérica, conforme demonstrado pela **Tabela 4**.

Tabela 4 - Fatores de virulência identificados na cepa UPEC-46

Característica de virulência	Fatores de virulência	Propriedade associada	Grupo de <i>E. coli</i> associado	
Adesão/invasão	Aap	Dispersina	DEC	
	Aat	Sistema de secreção da dispersina ¹	DEC	
	Csg	Curli ¹	Vários	
	IbeB	Proteína de invasão	ExPEC	
	IbeC	Proteína de invasão	ExPEC	
	Nlpl	Lipoproteína	ExPEC	
	OmpA	Proteína de membrana externa	ExPEC	
	ColE1	Colicina E1	ExPEC	
Bacteriocina	Mcb	Microcina B17 ¹	ExPEC	
	Ecp	<i>Pilus</i> comum de <i>E. coli</i> ¹	Vários	
Fímbria <i>chaperona-usher</i>	Fim	Fímbria tipo 1 ¹	Vários	
	Sfm	Fímbria Sfm ¹	ExPEC	
	Yad	Fímbria Yad ¹	ExPEC	
	Ybg	Fímbria Ybg ¹	ExPEC	
	Ycb	Fímbria Ycb ¹	ExPEC	
	Yde	Fímbria Yde ¹	ExPEC	
	Yeh	Fímbria Yeh ¹	ExPEC	
	Yfc	Fímbria Yfc ¹	ExPEC	
	Yhc	Fímbria Yhc ¹	ExPEC	
	Yra	Fímbria Yra ¹	ExPEC	
	Sistemas de aquisição de ferro	Efe	Sistema Efe ¹	Vários
		Ent, Fep	Enterobactina ¹	Vários
Fec		Transporte de citrato férrico ¹	Vários	
Feo		Transporte ferroso ¹	Vários	

(continua)

(conclusão)

Característica de virulência	Fator(es) de virulência	Propriedade associada	Grupo de <i>E. coli</i> associado
Sistemas de aquisição de ferro	Fhu	Aquisição de ferricromo ¹	Vários
	Ybt, Irp2, Irp1	Sistema biossintético de yersiniabactina ¹	Vários
	FyuA	Receptor sideróforo de yersiniabactina	ExPEC
Resistência sérica	Iss	Sobrevivência ao soro	ExPEC
	Etk, Etp, Gfc	Cápsula do grupo IV ¹	ExPEC
SST2	Gsp	Sistema de secreção <i>gsp</i> ¹	Vários
SST3	Eiv, Epa, Epr	ETT2 ²	Vários
T4P	AFP	<i>Pilus</i> AFP ¹	DEC
SST5	AatA	Autotransportadora de APEC	ExPEC
	Pet	Autotransportadora Pet	DEC
	UpaC	Autotransportadora de UPEC	ExPEC
	Upal	Autotransportadora de UPEC	ExPEC
	EhaC	Autotransportadora de EHEC	DEC
	AAI	<i>aggR-activated island</i> ²	DEC
Toxinas	AstA	Toxina EAST1	DEC
	HlyE	Hemolisina E	ExPEC

Os diferentes fatores de virulência foram identificados pelo banco de dados *ecoli VF collection* utilizando para isso a sequência de proteínas anotadas da cepa UPEC-46 por meio do programa *Prokka*.

SST2, sistema de secreção do tipo II; SST3, sistema de secreção do tipo III; SST5, sistema de secreção do tipo V; SST6, sistema de secreção do tipo VI; T4P, *Pilus* tipo IV.

¹presença do *operon* completo; ²presença do *operon* incompleto.

O genoma completo da cepa UPEC-46 foi submetido ao *GenBank* para depósito (*BioProject ID*: PRJNA728080; *BioSample accession*: SAMN19068351) e encontra-se aguardando curadoria da sequência para disponibilização da versão final.

4.2.2 Análise da presença de sequências de fagos

A busca por sequências de fagos na cepa UPEC-46 identificou quatro regiões contendo genes de diferentes fagos, variando de 16 a 42 kb (**Tabela 5**). Embora o banco de dados tenha considerado intacta as sequências de fagos identificadas, apenas a sequência 1 foi compatível com o tamanho previsto do fago *Shigella phage Sfil*, cuja sequência completa do genoma depositado no banco de dados NCBI é de ~41,8 kb. Além disso, partes dos fagos *Stx2-converting phage*, *Shigella phage SflV* e *Enterobacteria phage BP-4795*, foram detectados no genoma da cepa UPEC-46, tanto no plasmídeo p46-1 (*contig* 3) quanto no cromossomo bacteriano.

Tabela 5 - Sequências de fagos detectados no genoma da cepa UPEC-46

Fago	Tamanho (kb)	Nome do fago / Nº de acesso ao GenBank	Conteúdo G+C (%)	Contíg	Região
1	41,8	<i>Shigella phage SfIII</i> / NC_021857	49,21	1	Cromossomo
2	17,9	<i>Stx2-converting phage</i> / NC_011357	50,20	3	Plasmídio
3	23,1	<i>Shigella phage SfIV</i> / NC_022749	48,13	3	Plasmídio
4	16,2	<i>Enterobacteria phage BP-4795</i> / NC_004813(17)	56,20	5	Cromossomo

As diferentes sequências de fagos foram identificadas no genoma da cepa UPEC-46 pelo programa PHASTER.

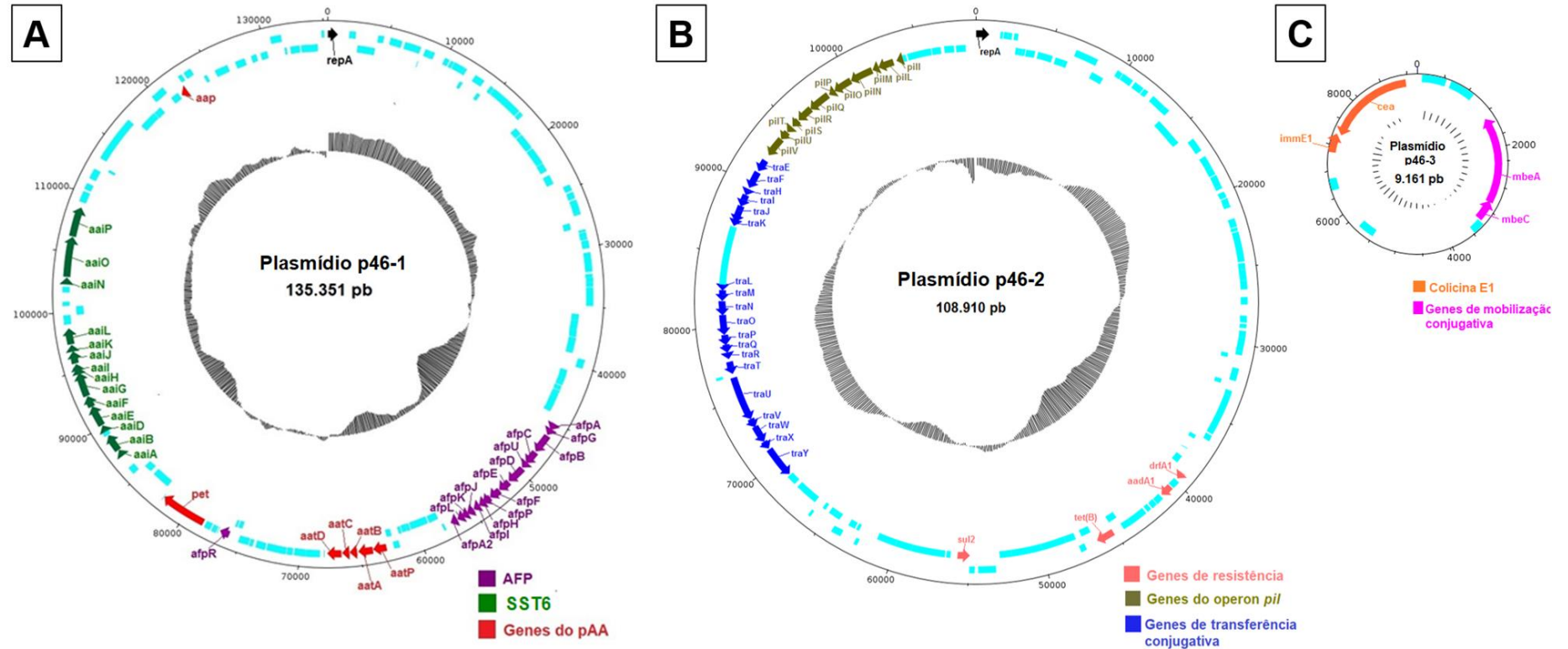
4.2.3 Análises dos plasmídios

As análises das sequências dos plasmídios mostraram que o plasmídio p46-1 (~135 kb) contém o *operon* completo da adesina AFP (*afpA*, *G*, *B*, *C*, *U*, *D*, *E*, *F*, *P*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L* e *A2*), bem como o gene *afpR*, que codifica um regulador transcricional da família AraC. Esse plasmídio também codifica o SST6 denominado *aai*, que apresenta os genes *aaiA-P*, exceto *aaiC* e *aaiM*. Além disso, o plasmídio p46-1 abriga os seguintes genes associados a EAEC: *operon aatAP-D*, *aap* e *pet* (**Figura 16A**), associados ao plasmídio pAA presente na cepa protótipo EAEC 042 (CHAUDHURI et al., 2010).

O plasmídio p46-2 (~109 kb) apresenta os seguintes genes de resistência a antibióticos: *aadA1*, *dfrA1*, *sul2* e *tet(B)*, responsáveis pela resistência à estreptomicina, trimetoprim, sulfametoxazol e tetraciclina, respectivamente. Além disso, este plasmídio é conjugativo, característica confirmada por ensaio de conjugação verificado no estudo de Salvador (2006). Com relação aos genes associados à conjugação, esse plasmídio alberga o *operon* de biossíntese da fímbria do tipo 4 denominada Pil, composta por 12 genes (*pill*, *L*, *M*, *N*, *O*, *P*, *Q*, *R*, *S*, *T*, *U* e *V*), além do *operon* de transferência (*tra*) conjugativa de *E. coli* (**Figura 16B**).

Por fim, o menor plasmídio de ~9 kb, denominado plasmídio p46-3, abriga os genes responsáveis pela síntese da colicina E1 (*cea* e *immE1*), além dos genes *mbeA* e *mbeC* associados a proteínas de mobilização conjugativa (**Figura 16C**).

Figura 16 - Estrutura dos três plasmídios presente na cepa UPEC-46



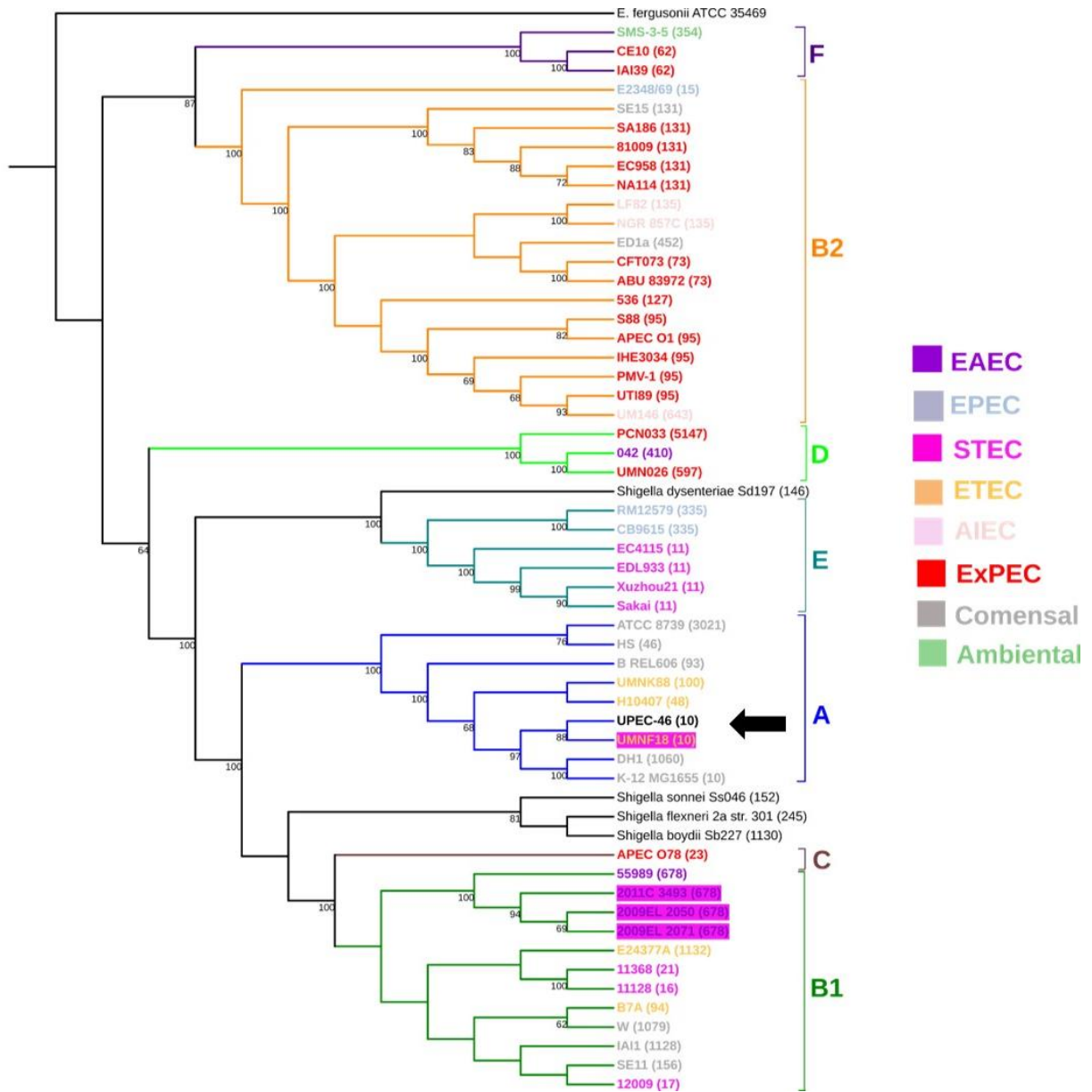
Uma comparação da arquitetura de três plasmídios presentes na cepa UPEC-46, onde as CDS são apresentadas em azul claro e o conteúdo G+C é mostrado em círculos internos pretos. As imagens dos plasmídios foram geradas por meio do programa *DNAPlotter*. **(A)** O plasmídeo p46-1 (plasmídeo de virulência) apresenta em vermelho os genes virulência tipicamente associados a EAEC (*aatP-D*, *aap* e *pet*). Em roxo estão representados os genes do operon *afp*, o qual apresenta 14 genes (*afpA - afpL* e *afpU*), mais um gene adicional homólogo a *afpA*, designado *afpA2*, além do gene regulador *afpR*. Em verde está representado o operon do SST6 (AAI), apresentando os genes *aaiA-P*, exceto *aaiC* e *aaiM*. **(B)** O plasmídeo p46-2 (plasmídeo de resistência) alberga os genes para a fímbria Pil (*pilI-V*; mostrados em verde-oliva), os genes de transferência conjugativa presentes no operon *tra*, representados em azul e em salmão estão representados os genes *aadA1*, *dfrA1*, *sul2* e *tet(B)*, responsáveis pela resistência à estreptomicina, trimetoprim, sulfametoxazol e tetraciclina, respectivamente. **(C)** O plasmídeo p46-3 (plasmídeo colicinogênico) apresenta os genes para a síntese de colicina E1 (*cea* e *immE1*; mostrados em alaranjado) e os genes de mobilização conjugada (*mbeA* e *mbeC*; mostrados em rosa).

4.2.4 Análises filogenéticas

Nas análises filogenéticas, primeiramente um filograma foi construído avaliando a cepa UPEC-46 juntamente com genomas de 51 cepas de referência de *E. coli* obtidas em bancos de dados públicos. As linhagens de referência compreenderam diferentes grupos de *E. coli*, tais como cepas comensais, ambientais, DEC e ExPEC, que pertencem a diversas linhagens filogenéticas (A, B1, B2, C, D, E e F) e de MLST (**Figura 17**).

A maioria das cepas de *E. coli* comensais e de DEC analisadas pertenceram principalmente aos filogrupos A, B1 e E, e a maioria das cepas ExPEC ao filogrupo B2. A partir da construção deste filograma, pôde-se observar que a cepa UPEC-46 foi agrupada juntamente com cepas do filogrupo A, o qual incluiu tanto cepas comensais quanto de DEC. O ST10 foi o MLST mais prevalente nos nove genomas de *E. coli* do filogrupo A, presente na cepa UPEC-46 e em mais duas cepas (DH1 e K-12 MG1655). Além disso, uma cepa de referência de *E. coli* do filogrupo A (cepa H10407 do ST46) é um membro do complexo clonal 10 (CC-10).

Figura 17 - Filograma da cepa UPEC-46 e das diferentes cepas de referência de *E. coli*



O filograma baseado em SNP foi construído por meio do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. O resultado foi visualizado com o auxílio programa online *iTOL* e valores de *bootstrap* abaixo de 50 removidos. Como *outgroup* foram utilizadas quatro cepas de *Shigella spp.* e uma *E. fergusonii*. Os diferentes grupos das cepas de *E. coli* (comensal, ambiental, EAEC, EPEC, STEC, ETEC, AIEC e ExPEC) e filogrupos (A, B1, B2, C, D, E e F) estão representados em diferentes cores. Os números de ST da análise MLST para cada cepa estão representados no filograma entre parênteses. A seta preta evidencia a cepa UPEC-46.

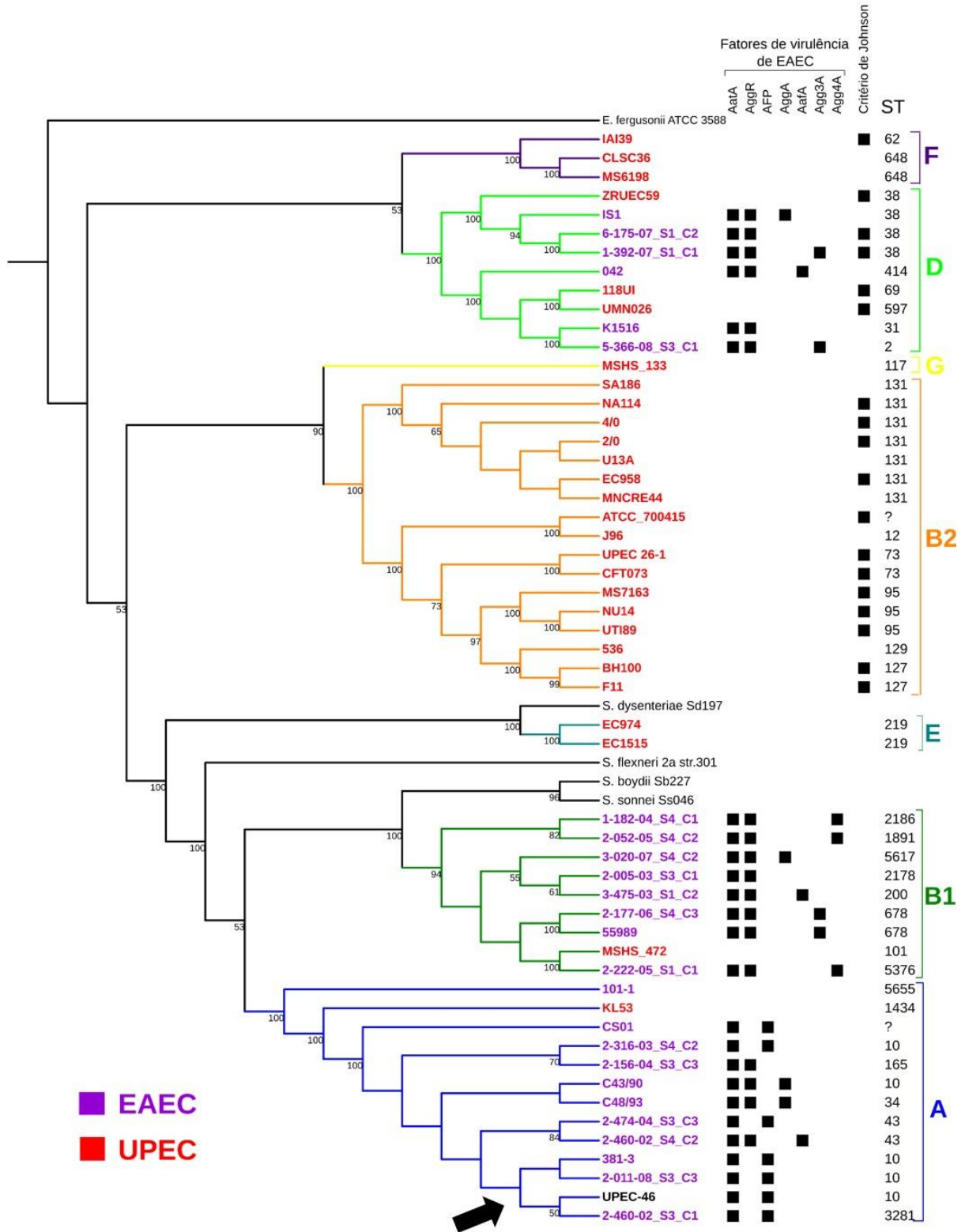
O segundo filograma identificou a relação entre a cepa UPEC-46 e diferentes cepas de *E. coli* classificadas como EAEC e UPEC, pertencentes a diversas linhagens de MLST e filogenéticas. Por meio da árvore construída, pôde-se observar que as cepas se clusterizaram em quatro ramos filogenéticos principais (**Figura 18**).

O primeiro ramo filogenético foi composto por cepas dos filogrupos D e F, incluindo a cepa protótipo EAEC 042, duas cepas EAEC positivas ao critério classificatório de ExPEC (JOHNSON et al., 2003), três EAEC negativas a este critério e seis cepas UPEC. O segundo ramo composto por cepas do filogrupo B2 e G, incluiu apenas cepas pertencentes ao patotipo UPEC. Já o terceiro ramo incluiu apenas duas cepas UPEC do filogrupo E, negativas ao critério classificatório de ExPEC.

Por último, o maior ramo filogenético foi composto por cepas do filogrupo A e B1, alocando 19 cepas EAEC e duas UPEC, todas negativas ao critério de Johnson et al (2003), além da cepa UPEC-46. Além disso, um *cluster* estreitamente relacionado nesse quarto ramo foi constituído pela cepa UPEC-46 e outras três EAEC atípicas (cepas 381-3; 2-011-08_S3_C3 e 2-460-02_S3_C1), negativas ao AggR, positivas a adesina AFP e ao AatA. Os isolados pertencentes a este cluster foram obtidos tanto de casos de diarreia e controles saudáveis (**Apêndice B**). Portanto, os resultados obtidos nesta análise indicaram um padrão filogenético semelhante entre a UPEC-46 e cepas EAEC atípicas positivas a adesina AFP.

Com relação aos STs, pode-se observar que nenhum dos patotipos (EAEC ou UPEC) e ramos filogenéticos analisados apresentaram STs idênticos (exceto o filogrupo E com as cepas EC974 e EC1515 do ST219). Assim, os diversos STs detectados indicam uma alta diversidade filogenética no painel de cepas analisadas.

Figura 18 - Filograma e características genéticas da cepa UPEC-46 e de cepas EAEC e UPEC



Filograma baseado em SNP e características genéticas das cepas EAEC (mostradas em roxo), UPEC (mostradas em vermelho) e da cepa UPEC-46 (mostrada em preto). A árvore filogenética foi construída por meio do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. O resultado foi visualizado com o auxílio programa online *iTOL* e valores de *bootstrap* abaixo de 50 removidos. Como *outgroup* foram utilizadas quatro cepas de *Shigella*

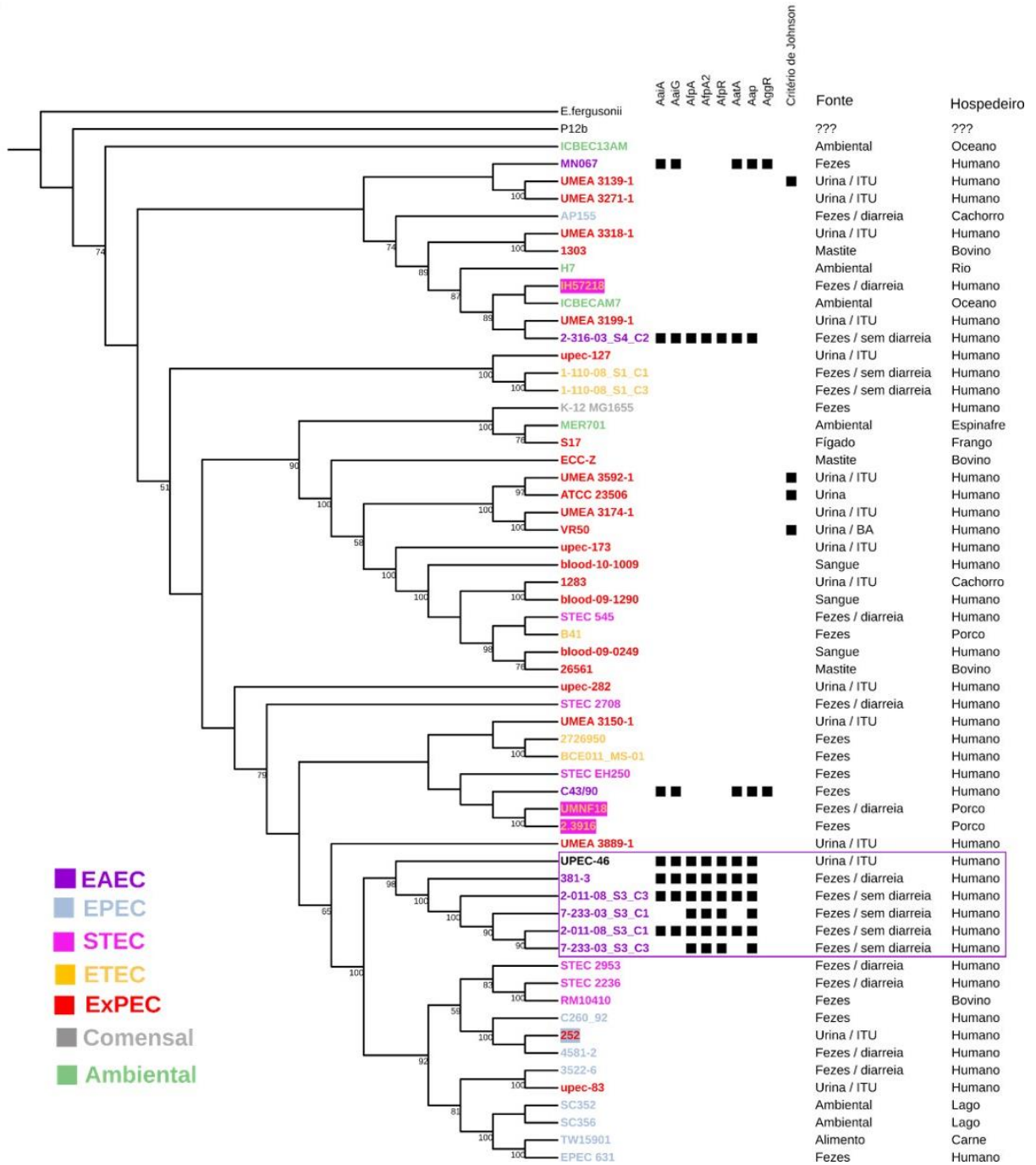
spp. e uma *E. fergusonii*. Os diferentes filogrupos das cepas de *E. coli* (A, B1, B2, D, E, F e G) estão representados em diferentes cores. Os números de ST da análise MLST para cada cepa de *E. coli* estão representados no filograma. As cepas foram consideradas positivas para ao critério de Johnson et al. (2003), ou seja, critério para classificação da cepa em ExPEC⁺. A seta preta evidencia o ramo de cepas do filogrupo A na qual estão intimamente relacionadas a cepa UPEC-46, sendo estas cepas de EAEC atípicas positivas a adesina AFP.

No terceiro filograma foi analisada a relação entre a cepa UPEC-46 e diversas linhagens de *E. coli* do ST10, obtidas de diversas fontes de isolamento e diferentes hospedeiros (**Figura 19**).

A análise deste filograma mostrou que a cepa UPEC-46 apresenta relação filogenética com cepas de EAEC atípica com perfil de virulência bastante semelhante, sendo estas negativas ao regulador AggR, positivas a fatores de virulência associados à adesina AFP (AfpA, AfpA2 e AfpR), além de outros fatores associados ao patotipo EAEC, tais como AatA, Aap e a ilha de patogenicidade AAI (AaiA/AaiG). Além disso, essas cepas foram isoladas de fezes humanas, como parte da microbiota ou envolvidas em infecções intestinais e foram negativas ao critério de Johnson.

Assim, podemos inferir pelas três comparações filogenéticas realizadas que embora a cepa UPEC-46 tenha sido isolada de um paciente apresentando ITU sintomática, essa cepa apresenta similaridade filogenética com cepas de EAEC atípica isoladas de fezes humanas, positivas a adesina AFP e a outros fatores de virulência associados à EAEC.

Figura 19 - Filograma e características genéticas da cepa UPEC-46 e de cepas de *E. coli* pertencentes ao ST10



Filograma baseado em SNP, informações e características genéticas da cepa UPEC-46 e de diferentes cepas de *E. coli* do ST10. A árvore filogenética foi construída por meio do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. O resultado foi visualizado com o auxílio programa online *iTOL* e valores de *bootstrap* abaixo de 50 removidos. Como *outgroup* foi utilizada a cepa *Escherichia fergusonii*. Os diferentes grupos das cepas de *E. coli* (comensal, ambiental, EAEC, EPEC, STEC, ETEC, AIEC e ExPEC) estão representados em diferentes cores. As cepas foram consideradas positivas para ao critério de Johnson (critério para classificação da cepa em ExPEC⁺) se positivas para dois ou mais marcadores de virulência de ExPEC dentre cinco, ou seja, *papA/papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* e *kpsMTII* (Johnson et al., 2003). Informações referentes à fonte de isolamento e tipo de hospedeiro na qual as cepas de *E. coli* foram obtidas estão presentes nas colunas ao lado dos fatores de

virulência. Na caixa roxa estão indicados a cepa UPEC-46 além de outras cepas de *E. coli* com perfil de virulência semelhante (positivas para fatores de virulência relacionados à adesina AFP).

BA = bacteriúria assintomática.

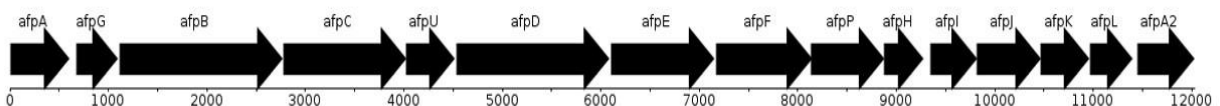
4.3 Caracterização genotípica de AFP

A presença de genes relacionados à adesina AFP, tais como *afpA*, *afpA2* e *afpR*, foi detectada nas diferentes linhagens de EAEC filogeneticamente associadas à cepa UPEC-46, representadas nas análises filogenéticas apresentadas nas **Figura 18 e 19**. Considerando que a adesina AFP foi descrita recentemente (LANG et al., 2018), são necessários estudos com informações sobre as características genotípicas das cepas AFP⁺ e se tais cepas apresentam uma convergência em termos da presença de diferentes fatores de virulência associados a DEC e ExPEC. Para esse fim, diferentes análises *in silico* foram realizadas com o intuito de determinar a similaridade dos genomas das cepas AFP⁺ com base na presença/ausência de diferentes fatores de virulência.

4.3.1 Análises *in silico* e identidade da sequência dos genes de AFP

Inicialmente, a análise da sequência do *locus afp* na cepa UPEC-46, indicou um tamanho de ~12 kb com a presença de 14 genes associados ao *operon afp* (*afpA–afpL* e *afpU*), bem como um homólogo adicional do gene principal da pilina *afpA*, sendo este denominado de *afpA2*. Uma visão esquemática da estrutura do *operon afp* da cepa UPEC-46, bem como a função predita de cada proteína codificada por esse *operon*, estão representadas nas **Figura 20 e Tabela 6**, respectivamente.

Figura 20 - Visão geral esquemática da estrutura do *operon afp* da cepa UPEC-46



O *operon afp* apresenta ~12 kb, sendo constituído por 14 genes principais (*afpA–afpL* e *afpU*) e o adicional *afpA2*. Os genes aqui representados estão proporcionais ao seu tamanho em pb. A imagem do *operon afp* foi gerada pelo programa *DNAPlotter*.

Tabela 6 - Predição das funções das proteínas codificadas pelo operon *afp* da cepa UPEC-46 e domínios conservados presentes

Nome	Funções prováveis da proteína	Domínios conservados
AfpA	Proteína de montagem do <i>pilus</i>	PilS
AfpG	Proteína hipotética	TcpQ
AfpB	Proteína de membrana	Secretina
AfpC	Proteína hipotética	Nenhum
AfpU	Proteína hipotética	Nenhum
AfpD	Proteína de ligação ao DNA; proteína da família do SST2/SST4	P-loop NTPase
AfpE	SST2, proteína F	PuIF
AfpF	Proteína da família do SST2/SST4	P-loop NTPase
AfpP	Prepilina peptidase	Peptidase A24
AfpH	Transglicosilase lítica	<i>Lysozyme like</i>
AfpI	Proteína hipotética	Nenhum
AfpJ	Proteína hipotética	Nenhum
AfpK	Proteína hipotética	Nenhum
AfpL	Proteína hipotética	Nenhum
AfpA2	Proteína de montagem do <i>pilus</i>	PilS

A predição das funções das proteínas do operon *afp* da cepa UPEC-46, bem como os domínios conservados presentes nelas, foram preditos pela ferramenta online *BLASTp* (*protein BLAST*).

SST2, sistema de secreção do tipo II; SST4, sistema de secreção do tipo IV.

Em seguida foi pesquisada a distribuição do operon *afp* nos genomas de outras cepas de *E. coli*. Para isso, a análise foi feita por meio da ferramenta *BLASTn* do NCBI com o operon *afp* da cepa UPEC-46 como sequência de consulta (*query sequence*). Como resultado foram identificados 25 genomas de cepas de *E. coli* AFP⁺ dentre todos os genomas disponíveis analisados.

Ao contrário do observado para a cepa UPEC-46, 19 cepas AFP⁺ foram isoladas de fezes humanas, tanto em pacientes com ou sem diarreia. As outras seis cepas não apresentaram informações suficientes quanto à fonte de isolamento ou hospedeiro. Informações relacionadas ao número de acesso do *GenBank*, patotipo, tipo de hospedeiro, país e fonte de isolamento, referentes as 25 cepas de *E. coli* AFP⁺ positivas estão listadas na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Características gerais das 25 cepas *E. coli* AFP+

Cepa de <i>E. coli</i>	Nº de acesso no <i>GenBank</i>	Patotipo	País	Fonte de isolamento	Hospedeiro
12-05829	GCA_900536625.1	EAEC/STEC	Alemanha	Fezes/diarreia	Humano
2-005-03_S4_C1	GCA_000703845.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
2-011-08_S3_C1	GCA_000700505.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
2-011-08_S3_C2	GCA_000687025.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
2-011-08_S3_C3	GCA_000687065.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
2-316-03_S4_C2	GCA_000704325.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
2-460-02_S3_C1	GCA_000704465.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
2-460-02_S3_C2	GCA_000704485.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
2-474-04_S3_C1	GCA_000704585.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
2-474-04_S3_C2	GCA_000704605.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
2-474-04_S3_C3	GCA_000704665.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
3-073-06_S3_C2	GCA_000704905.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
381-3	GCA_000948005.1	EAEC	Holanda	Fezes/diarreia	Humano
401368	GCA_004523405.1	EAEC	Quênia	Fezes/diarreia	Humano
7-233-03_S3_C1	GCA_000713235.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
7-233-03_S3_C3	GCA_000713355.1	EAEC	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano
AM22-15AC	GCA_003471095.1	EAEC	China	Fezes/sem diarreia	Humano
AM34-8	GCA_003467875.1	EAEC	China	Fezes/sem diarreia	Humano
CS01	GCA_000740545.1	EAEC	EUA	Fezes/sem diarreia	Humano
DEC6C	GCA_000249635.2	EAEC	ND	ND	ND
ECM-1	GCA_003057355.1	EAEC	Líbano	ND	Humano
MRE600	GCA_001542675.2	EAEC	ND	Ambiental	ND
NCTC9035	GCA_900450155.1	EAEC	ND	ND	ND
NCTC9062	GCA_900449035.1	EAEC	ND	ND	ND
NCTC9097	GCA_900449495.1	EAEC	ND	ND	ND

Todas as informações presentes na tabela foram obtidas pelo número de acesso da cepa no *GenBank* do NCBI.

ND: Não determinado.

A identidade nucleotídica dos genes do *operon afp* da cepa UPEC-46 comparada às sequências das 25 diferentes cepas analisadas foi superior a 95% para importantes genes, tais como *afpGBCUDEFPHA2* e o regulador *afpR*, confirmando que tais genes são altamente conservados em cepas que carregam o locus *afp* (**Tabela 8**). Todas as cepas foram positivas ao *operon* completo de *afp*, e apenas a cepa 2-474-04_S3_C1 foi negativa ao gene *afpR*.

O gene *afpA* foi o que apresentou uma maior diversidade quanto a sua sequência de nucleotídeos. Com exceção das cepas 2-316-03_S4_C2; 381-3; AM22-15AC e AM34-8, todas as outras apresentaram identidade nucleotídica inferior a 80%. Para entender melhor as regiões conservadas e variáveis do gene *afpA*, a sequência dos diferentes genes *afpA* foram alinhadas utilizando como sequência de referência a UPEC-46. Nas sequências de nucleotídeos analisadas foi observado uma grande variabilidade de nucleotídeos, principalmente após o nucleotídeo 225, ao passo que a região mais conservada foi verificada nos primeiros nucleotídeos da sequência do gene. O **Apêndice E** apresenta o alinhamento das sequências de nucleotídeos para o gene *afpA* obtidas em todas as 26 cepas AFP positivas analisadas.

Nas sequências traduzidas para aminoácidos (**Apêndice F**) foram observados perfis conservados semelhantes as análises nucleotídica, na qual até o aminoácido 74 houve apenas seis alterações de aminoácidos quanto compara a cepa UPEC-46. Na cepa de *E. coli* CS01 a inserção de um nucleotídeo na posição 22 gerou um *codon* de terminação prematuro no décimo aminoácido.

Tabela 8 - Identidade de alinhamento de nucleotídeos (em %) dos genes do operon *afp* das cepas encontradas no NCBI com os genes do operon *afp* da cepa UPEC-46

Cepas	UPEC-46															
	<i>afpA</i>	<i>afpG</i>	<i>afpB</i>	<i>afpC</i>	<i>afpU</i>	<i>afpD</i>	<i>afpE</i>	<i>afpF</i>	<i>afpP</i>	<i>afpH</i>	<i>afpI</i>	<i>afpJ</i>	<i>afpK</i>	<i>afpL</i>	<i>afpA2</i>	<i>afpR</i>
2-005-03_S4_C1	72,00	98,34	97,35	97,70	98,81	98,53	98,69	97,95	97,87	99,40	83,44	94,76	92,65	87,78	96,76	96,73
2-011-08_S3_C1	71,00	98,58	97,11	98,11	98,42	98,85	98,79	98,46	98,53	99,40	87,12	93,72	92,27	89,90	96,25	97,09
2-011-08_S3_C2	72,00	98,58	97,35	97,70	98,81	98,53	98,69	97,95	97,87	99,40	83,44	94,76	92,65	87,78	96,76	96,73
2-011-08_S3_C3	71,00	98,34	97,11	98,11	98,42	98,85	98,79	98,46	98,53	99,40	87,12	93,72	92,27	89,90	96,25	97,09
2-316-03_S4_C2	91,19	100	99,63	99,42	99,60	99,61	99,59	99,38	99,86	100	88,89	97,23	96,58	95,40	99,31	99,87
2-460-02_S3_C1	73,90	98,81	97,35	97,78	98,81	98,65	98,69	98,56	98,00	99,40	87,53	93,62	94,21	90,36	96,93	97,10
2-460-02_S3_C2	73,90	98,81	97,35	97,78	98,81	98,65	98,69	98,77	98,00	99,40	87,53	93,62	94,21	90,36	96,93	97,10
2-474-04_S3_C1	72,00	98,58	97,35	97,70	98,81	98,53	98,69	97,95	97,87	99,40	83,44	94,76	92,65	87,78	96,76	-
2-474-04_S3_C2	72,00	98,58	97,35	97,70	98,81	98,53	98,69	97,85	97,87	99,40	83,44	94,76	92,65	87,78	96,76	96,73
2-474-04_S3_C3	72,00	98,58	97,35	97,70	98,81	98,53	98,69	97,95	97,87	99,40	83,44	94,76	92,65	87,78	96,76	96,73
3-073-06_S3_C2	72,00	98,58	97,35	97,70	98,81	98,53	98,69	97,95	97,87	99,40	83,44	94,76	92,46	87,78	96,76	96,73
7-233-03_S3_C1	71,00	98,34	97,11	98,11	98,42	98,78	98,79	98,46	98,53	99,40	88,75	93,72	92,47	89,90	96,25	97,09
7-233-03_S3_C3	71,00	98,58	97,11	98,11	98,42	98,85	98,79	98,46	98,53	99,40	88,75	93,72	92,47	89,90	96,25	97,09
12-05829	73,00	98,81	96,76	97,87	99,01	98,78	98,69	98,67	98,27	99,70	86,91	92,61	94,01	90,36	97,10	96,73
381-3	92,00	99,76	99,81	99,50	99,40	99,74	99,59	99,69	100	100	88,89	98,61	96,60	95,17	99,14	100
401368	75,10	98,81	97,23	97,78	99,01	98,72	98,59	98,67	98,14	99,70	85,28	94,15	94,21	90,57	97,10	96,86
AM22-15AC	99,19	100	99,94	100	100	99,87	100	99,89	100	100	100	99,53	99,80	98,18	99,82	100
AM34-8	91,94	100	99,81	99,75	99,80	99,74	99,69	99,89	100	100	90,12	96,33	97,18	94,48	99,82	99,63
CS01	70,00	98,34	97,29	97,54	98,41	98,46	98,59	98,16	97,61	99,11	84,19	94,61	92,65	88,03	96,59	96,62
DEC6C	75,30	98,81	97,17	97,62	98,42	98,72	98,79	98,77	98,14	99,10	87,73	94,20	94,21	90,57	97,10	97,22
ECM-1	73,50	98,58	97,41	97,70	98,81	98,53	98,69	97,95	97,87	99,40	82,72	93,53	91,86	87,01	96,76	96,86
MRE600	73,70	98,58	97,35	97,70	98,81	98,59	98,69	98,05	97,87	99,40	84,46	95,07	93,05	88,46	96,76	96,86
NCTC9035	73,20	98,81	97,29	98,03	98,81	98,72	98,59	98,36	98,14	99,70	84,66	94,15	93,65	90,34	97,10	96,98
NCTC9062	73,50	98,58	97,41	97,70	98,81	98,53	98,69	97,95	97,87	99,40	83,44	94,76	92,46	87,55	96,76	96,86
NCTC9097	73,80	98,58	97,41	97,70	98,81	98,53	98,69	98,16	97,87	99,40	84,05	94,79	92,85	87,78	96,76	96,86

A análise da identidade dos diferentes genes foi aferida pela ferramenta *BLASTn*

A partir das análises baseadas na identidade de nucleotídeos e os alinhamentos para o gene *afpA*, outras diferentes análises *in silico* foram realizadas para as 25 cepas AFP⁺ obtidas do banco de dados do NCBI e para a UPEC-46. Todas as características *in silico* analisadas para as diferentes cepas AFP⁺ estão presentes na **Tabela 9**.

Foi observado dentre as 26 cepas analisadas que 24 pertenciam ao filogrupo A, enquanto duas cepas foram alocadas no filogrupo B1. Quanto ao MLST, o ST10 e ST43 foram os mais prevalentes, sendo presentes em dez e seis cepas, respectivamente. Todas as dez cepas restantes pertenciam a outros diferentes STs.

Com relação ao sorogrupo O das cepas, observou-se a presença de 10 diferentes sorogrupos, sendo o sorogrupo O111 o mais prevalente, considerando que em 13 cepas não foi possível determinar o sorogrupo. Os isolados apresentaram sete tipos flagelares H diferentes, onde 21 cepas apresentaram apenas os tipos H10, H2 e H30, presentes em 11, seis e quatro cepas, respectivamente.

Além disso, na análise da presença de origens de replicação plasmidial foi observado que todas as cepas analisadas abrigaram pelo menos um *replicon* plasmidial, sendo a sequência plasmidial IncF, presente no plasmídio p46-1 da cepa UPEC-46, a mais prevalente, presente em todas as cepas analisadas (exceto a cepa 381-3). O *replicon* IncB/O/K/Z, associado ao plasmídio p46-2 (resistência) na UPEC-46, foi o segundo mais prevalente sendo encontrado em 12 cepas.

Quanto à presença de genes de virulência associados à EAEC, foi verificado que as diferentes cepas analisadas não apresentaram um perfil similar de virulência, sendo estes genes diferentemente distribuídos entre as 26 cepas AFP⁺. Os genes *aatA* e *aap* foram os mais prevalentes, presentes em 24 cepas, ao passo que outros genes, tais como *astA*, *pic* e *pet* foram menos prevalentes.

Por fim, ao analisar os genes de resistência a antibióticos foram observados diferentes perfis de resistência, na qual apenas oito cepas foram negativas aos genes analisados pelo programa *ResFinder*. Além disso, dos diferentes genes de resistência presentes nas cepas AFP positivas, os genes *sul1*, *sul2* e *sul3*, que conferem resistência às sulfonamidas foram os mais prevalentes, sendo encontrados em 15 isolados.

Tabela 9 - Caracterização genotípica das cepas AFP+

Cepas AFP positivas	Filogrupo	Sorotipo	ST	Replicons de plasmídios	Genes associados a EAEC	Genes de resistência a antibióticos
2-005-03_S4_C1	A	OND:H10	43	IncB/O/K/Z, IncFII, IncQ1	<i>aatA, aap</i>	<i>sul1, sul2, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, tet(A), dfrA14, dfrA7, blaTEM-1B</i>
2-011-08_S3_C1	A	OND:H10	10	Col, IncFII	<i>aatA, aap, astA</i>	<i>sul2, dfrA8, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B</i>
2-011-08_S3_C2	A	O111:H12	43	ColpVC, IncB/O/K/Z, IncFII, IncQ1	<i>aatA, aap</i>	<i>blaTEM-1B, tet(A), dfrA14, dfrA7, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul1, sul2</i>
2-011-08_S3_C3	A	OND:H10	10	IncFII	<i>aatA, aap, astA</i>	<i>dfrA8, aph(6)-Id, blaTEM-1B</i>
2-316-03_S4_C2	A	OND:H10	10	IncFII	<i>aatA, aap</i>	<i>blaTEM-1B, sul2, dfrA8, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
2-460-02_S3_C1	A	O111:H12	3281	IncB/O/K/Z, IncFII	<i>aatA, aap</i>	<i>dfrA14, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tet(A)</i>
2-460-02_S3_C2	A	O111:H12	3281	IncB/O/K/Z, IncFII	<i>aatA, aap</i>	<i>dfrA14, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tet(A)</i>
2-474-04_S3_C1	A	OND:H10	43	IncB/O/K/Z, IncFII, IncQ1	<i>aatA</i>	<i>blaTEM-1B, tet(A), dfrA14, dfrA7, sul1, sul2, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
2-474-04_S3_C2	A	OND:H10	43	IncB/O/K/Z, IncFII, IncQ1	<i>aatA, aap</i>	<i>blaTEM-1B, tet(A), dfrA14, dfrA7, sul1, sul2, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
2-474-04_S3_C3	A	OND:H10	43	IncB/O/K/Z, IncFII, IncQ1	<i>aatA, aap</i>	<i>blaTEM-1B, tet(A), dfrA14, dfrA7, sul1, sul2, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
3-073-06_S3_C2	A	OND:H10	43	IncFII, IncQ1	<i>aatA, aap</i>	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, tet(A), sul1, sul2, blaTEM-1B, dfrA7</i>
7-233-03_S3_C1	A	OND:H10	10	IncFII	<i>aap, astA</i>	-
7-233-03_S3_C3	A	OND:H10	10	Col, IncFII	<i>aap</i>	-
12-05829	B1	O23:H8	26	IncB/O/K/Z, IncFIB, IncFIC	<i>aatA, aap, astA</i>	-
381-3	A	O126:H2	10	IncB/O/K/Z	<i>aatA, aap</i>	<i>blaCTX-M-15, blaTEM-1B</i>
401368	A	O151:H12	10	Col, IncFIC, IncI1	<i>aatA, aap, pic, astA</i>	<i>dfrA14, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, blaTEM, sul2</i>
AM22-15AC	A	OND:H30	3075	ColpVC, IncFII, IncY	<i>aatA, aap, pet, astA</i>	<i>tet(A)</i>

(continua)

(conclusão)

Cepas AFP positivas	Filogrupo	Sorotipo	ST	Replicons de plasmídios	Genes associados a EAEC	Genes de resistência a antibióticos
AM34-8	A	O10:H32	1286	IncFII, IncX1	<i>aatA, aap, pet</i>	<i>blaTEM-1B, qnrS1, tet(A), sul3, aph(6)-Id</i>
CS01	A	OND:H30	?	IncB/O/K/Z, IncFIA, IncFIB, IncFII	<i>aatA, aap</i>	<i>dfrA5, tet(B), sul1</i>
DEC6C	A	O111:H12	10	IncFII	<i>aatA, aap</i>	-
ECM-1	A	OND:H30	2349	IncFIB, IncFII, IncI1, IncX3	<i>aatA, aap</i>	<i>sul2, tet(A), aadA1, dfrA1, qnrB7, qnrS1, qnrS2, blaCTX-M-15, blaTEM</i>
MRE600	A	O150:H9	?	IncFII	<i>aatA</i>	-
NCTC9035	A	O35:H10	10	IncFIC	<i>aatA, aap, pet, astA</i>	-
NCTC9062	A	O62:H30	34	IncB/O/K/Z, IncFII	<i>aatA, aap</i>	-
NCTC9097	B1	O97:H-	5466	IncFII	<i>aatA, aap</i>	-
UPEC-46	A	O116:H12	10	IncB/O/K/Z, IncFII	<i>aatA, aap, pet, astA</i>	<i>aadA1, sul2, tet(B), drfA1</i>

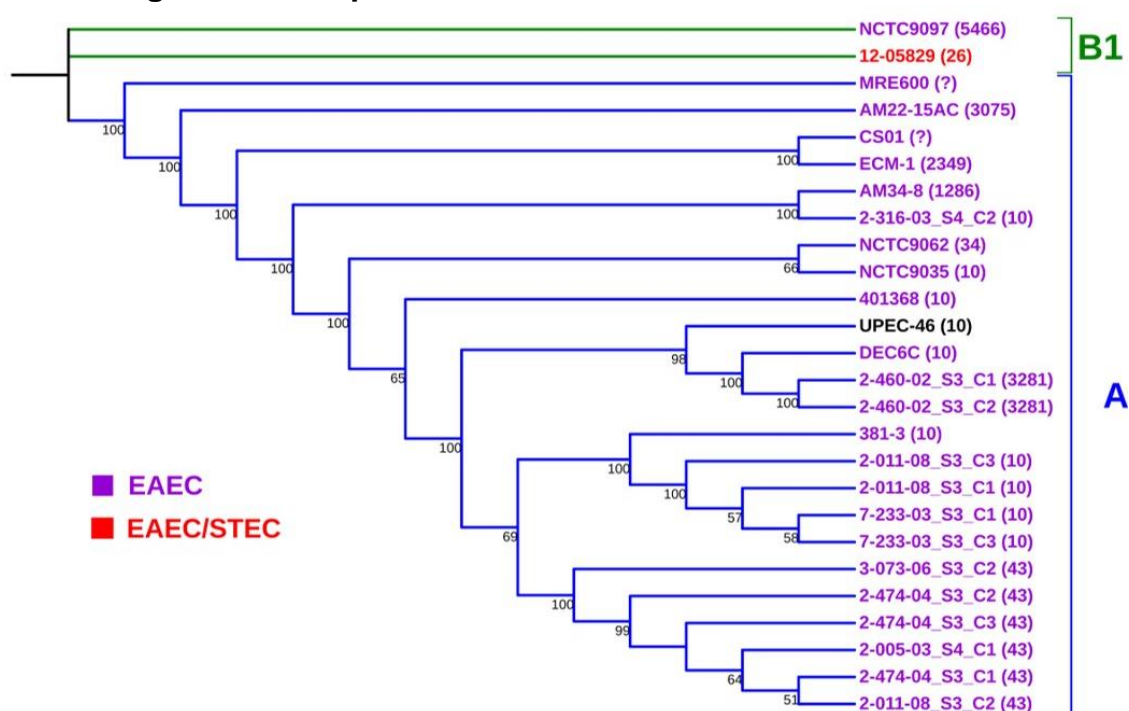
Para as diferentes análises *in silico* realizadas, o *draft* genômico das cepas AFP⁺ foi submetido a várias plataformas online de bioinformática disponíveis no site do *Center for Genomic Epidemiology*, para determinar: o filogrupo baseado no método de Clermont, usando o programa *ClermontTyping*; o sorotipo pelo programa *SerotypeFinder*; a presença e tipo de origens de replicação de plasmídios, usando o *PlasmidFinder*; presença de genes de resistência a antimicrobianos pelo programa *ResFinder* e o ST de acordo com a base de dados de MLST da Universidade de Warwick (Reino Unido), pelo programa *MLST*. Os seguintes genes de virulência associados à EAEC foram pesquisados: *aatA*, *aggR*, *aap*, *pet* e *pic*.

ND, não determinado.

4.3.2 Perfis de virulência das cepas AFP positivas

Após as diferentes análises *in silico* para a caracterização genotípica das cepas AFP⁺, foi avaliada a presença e ausência de diferentes fatores de virulência nessas linhagens. Para isso, uma árvore filogenética foi gerada para tais cepas utilizando como referência a cepa UPEC-46. O filograma gerado para as cepas AFP⁺ está representado na **Figura 21**.

Figura 21 - Filograma das cepas de *E. coli* AFP⁺



O Filograma baseado em SNP foi construído por meio do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. O resultado foi visualizado com o auxílio programa online *iTOL* e valores de *bootstrap* abaixo de 50 removidos. Os diferentes grupos das cepas de *E. coli* (EAEC e EAEC/STEC) e filogrupos (A e B1) estão representados em diferentes cores. Os números de ST da análise MLST para cada cepa estão representados no filograma entre parênteses. A cepa UPEC-46 está representada em preto.

Para a criação do *heat map*, foram pesquisados 398 principais fatores associados à virulência, presentes em diferentes grupos de *E. coli*, tais como comensal, DEC e ExPEC. Os resultados mais detalhados da presença/ausência desses fatores de virulência, bem como os nomes dos genes correspondentes associados à virulência estão representados no **Apêndice G**.

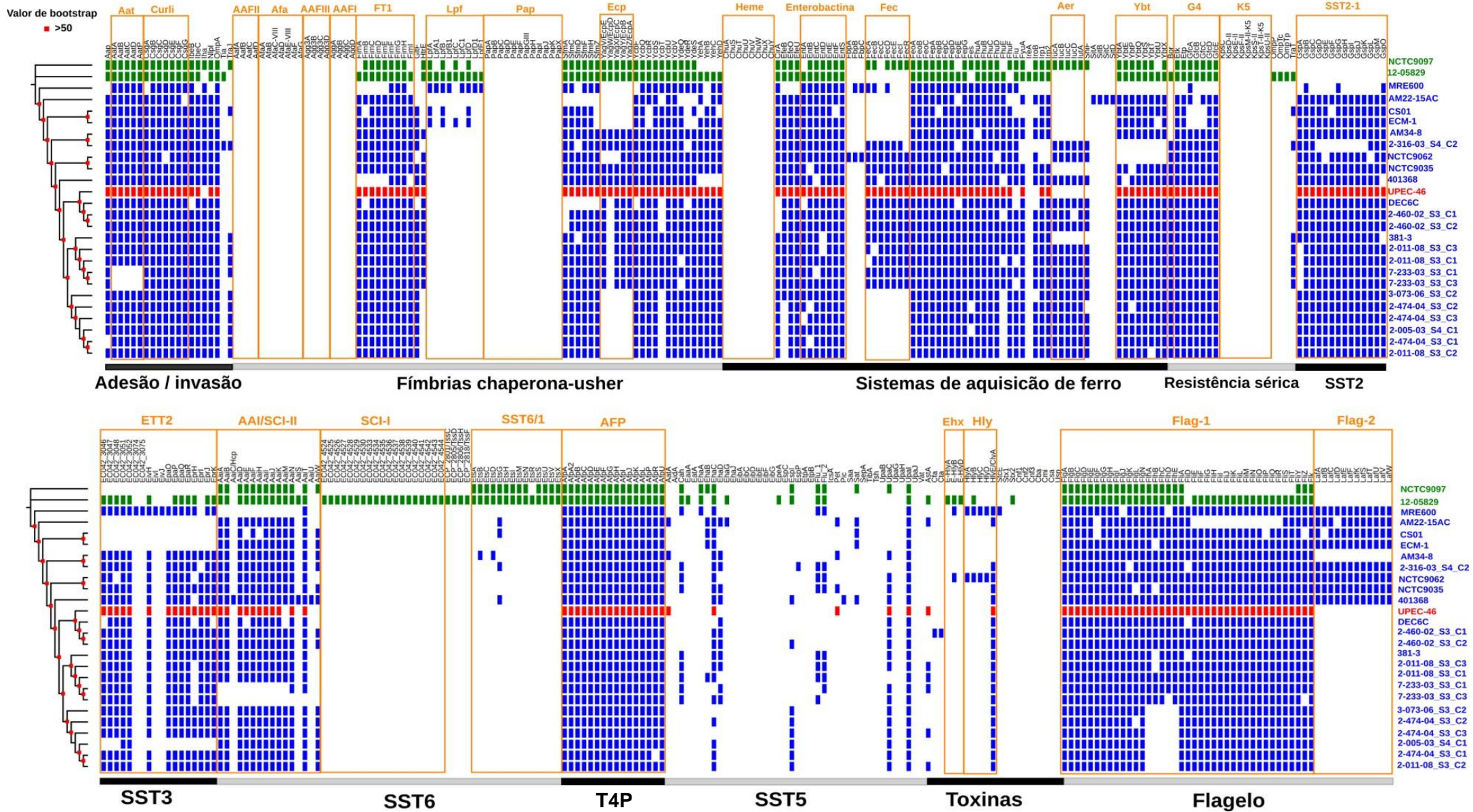
Como resultado, foi observada alta diversidade de fatores de virulência em cepas de *E. coli* AFP⁺, na qual todas as cepas foram positivas para determinantes de

virulência geralmente considerados amplamente presentes em isolados de *E. coli*, tais como o sistema de flagelos Flag-1, os *operons* que codificam a fímbria tipo 1 e curli. Por outro lado, outros importantes fatores de virulência, como vários sistemas de aquisição de ferro, tais como o sistema de transporte de citrato férrico (Fec), aerobactina (Aer) e yersiniabactina (Ybt), o sistema de secreção *gsp* (SST2-1), o sistema ETT2 e os sistemas de secreção do tipo 6 (SST6/1, AAI e SCI-I) não foram igualmente distribuídos em todas as cepas AFP⁺ analisadas.

Dependendo do grupo filogenético, as cepas AFP⁺ diferiram na presença dos fatores associados à virulência, mas algumas características genéticas semelhantes foram mais prevalentes nessas cepas, tais como a ausência de alguns fatores associados a ExPEC, como as adesinas Afa e Pap, e a cápsula K5, e fatores associados a EAEC, como as fímbrias AAFs e o regulador transcricional AggR. Além disso, devido as cepas pertencerem aos filogrupos A e B1, essas foram negativas para o sistema sideróforo Chu, usado para a classificação filogenética (**Figura 22**).

Portanto, analisando de modo geral podemos concluir que todas as 26 cepas positivas para AFP não apresentam um perfil de virulência único, embora alguns fatores de virulência sejam mais prevalentes, enquanto outros mais restritos a estas cepas.

Figura 22 - Heat map indicando a presença ou ausência de fatores de virulência em diferentes cepas de *E. coli* AFP+



Cada linha da matriz binária indica a presença ou ausência de um fator associado à virulência pela análise da sequência de aminoácidos pelo programa *BLASTP* +. Foram considerados como positivos fatores de virulência com valores mínimos de 1×10^{-10} de ponto de corte para o valor E ('-evaluate $1e-10$ '), 70% de ponto de corte para a identidade e cobertura. As classes de fatores de virulência estão indicadas abaixo de cada *heat map* em preto e cinza. Os nomes das cepas e os fatores de virulência positivos a elas estão representados por cores ligadas a afiliação do filogrupos a qual pertencem (verde para o filogrupos B1 e azul para o filogrupos A). A cepa UPEC-46 está presente em vermelho. Os *operons* comumente conhecidos de *E. coli* estão indicados por caixas laranja. O filograma baseado em SNP anexado aos *heat map* foi construído por meio do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. Valores de *bootstrap* acima de 50 estão representados em quadrados vermelhos nas bifurcações a qual pertencem. O resultado foi visualizado com o auxílio programa online *iTOL*. SST2, sistema de secreção do tipo II; SST3, sistema de secreção do tipo III; SST5, sistema de secreção do tipo V; SST6, sistema de secreção do tipo VI; T4P, *pilus* tipo IV.

4.4 Papel de AFP na patogênese da cepa UPEC-46

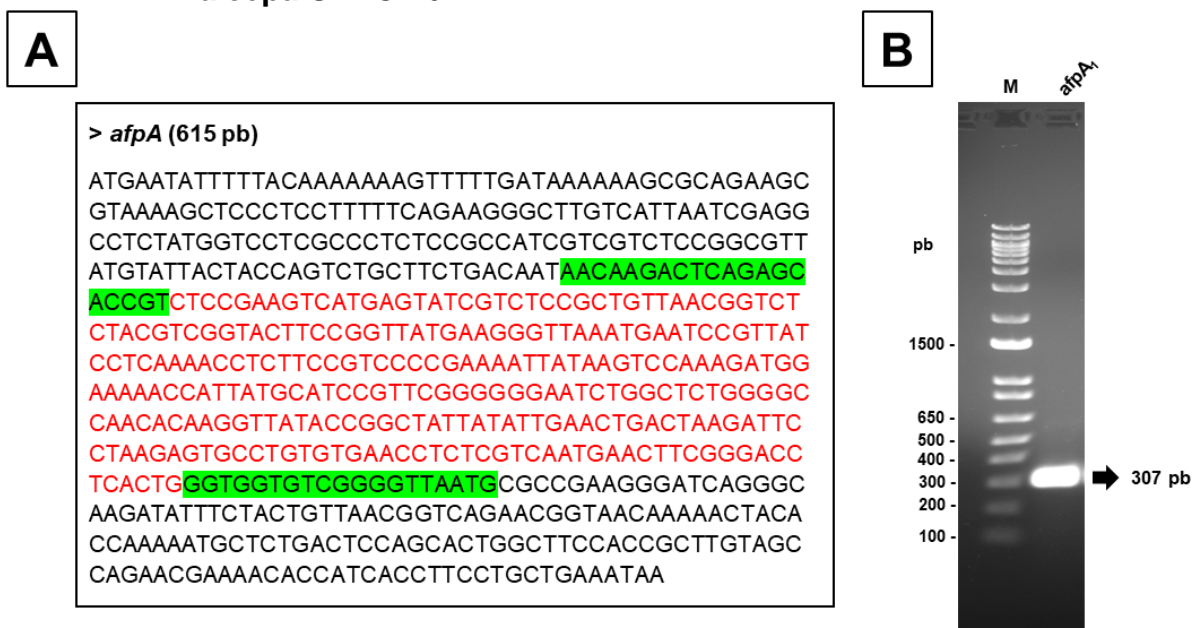
A partir das diferentes análises *in silico* das cepas AFP⁺ e os correspondentes resultados obtidos, a segunda etapa do presente estudo consistiu em analisar o papel da adesina AFP na patogênese da cepa UPEC-46. Para isso, cepas mutante e complementada no gene *afpA* foram construídas e avaliadas quanto ao seu papel na adesão utilizando diferentes linhagens de células epiteliais.

4.4.1 Construção da cepa mutante em *afpA*

A técnica de recombinação homóloga entre o fragmento interno do gene *afpA*, nomeado de *afpA*₁ e o vetor suicida pJP5603 (PENFOLD; PEMBERTON, 1992) foi utilizada para a construção da cepa UPEC-46 mutagenizada no gene *afpA*.

Inicialmente o fragmento interno *afpA*₁ de 307 pb foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores 4532-Fw e 4532-Rv por PCR a partir amostra UPEC-46. A região delimitada pelos iniciadores, bem como o produto da amplificação do fragmento interno *afpA*₁ estão representados na **Figura 23**.

Figura 23 - Localização no gene *afpA* e amplificação do fragmento interno *afpA*₁ na cepa UPEC-46



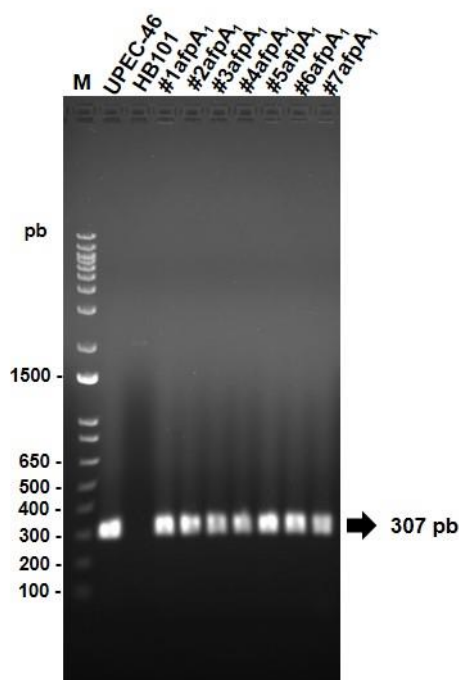
(A) Região completa do gene *afpA* de 615 pb na cepa UPEC-46. Em verde estão representados a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (4532-Fw e 4532-Rv) para a amplificação do fragmento interno *afpA*₁ de 307 pb, demonstrado em vermelho (Leitura 5' – 3').

(B) Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado por solução de *GelRed* para o produto de

amplificação do fragmento interno *afpA*₁ na cepa selvagem UPEC-46. A seta indica o tamanho correto do fragmento *afpA*₁ amplificado (307 pb). M: marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder* (Invitrogen).

A clonagem do fragmento interno *afpA*₁ (307 pb) foi inicialmente realizada no vetor pGEM-T *Easy*, para a inserção dos sítios de restrição para *EcoRI* nas suas extremidades. Para isso, após a amplificação, purificação e quantificação do produto de PCR correspondente a *afpA*₁, este foi ligado ao vetor pGEM-T *Easy* para transformação em *E. coli* DH5 α . O plasmídeo resultante da ligação entre o vetor pGEM-T *Easy* e o fragmento interno *afpA*₁ foi denominado pPAS1. Sete transformantes foram analisados por PCR quanto à presença do plasmídeo pPAS1 utilizando os iniciadores 4532-Fw e 4532-Rv. O fragmento *afpA*₁ foi detectado em todos os transformantes analisados (**Figura 24**).

Figura 24 - PCR para detecção do fragmento interno *afpA*₁ nos transformantes selecionados

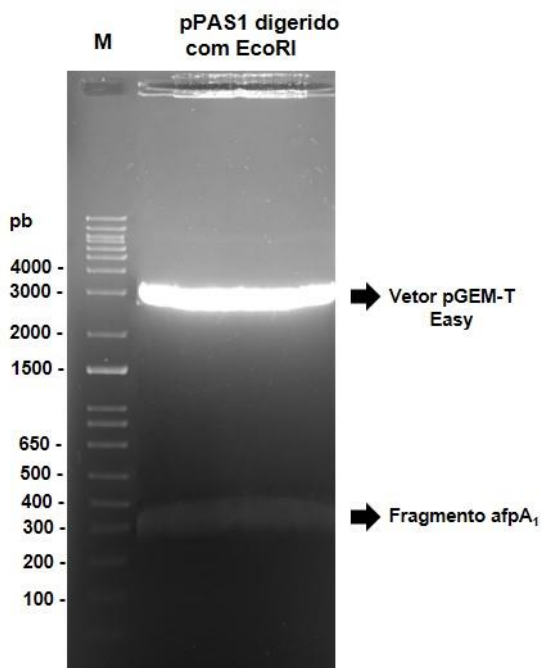


Eletróforese em gel de agarose (1,5%) corado por solução de *GelRed* para análise do produto de amplificação do fragmento interno *afpA*₁ nas cepas transformantes #1afpA₁ a #7afpA₁. A cepa UPEC-46 foi utilizada como controle positivo e a cepa *E. coli* HB101 como controle negativo. Todos os transformantes analisados apresentaram positividade para o fragmento *afpA*₁ e, conseqüentemente ao plasmídeo pPAS1. A seta indica o tamanho correto do fragmento *afpA*₁ amplificado (307 pb). M: marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder* (Invitrogen).

Após a detecção do fragmento *afpA*₁ em todas as cepas transformantes selecionadas, o transformante #1afpA₁ foi selecionado e nomeado como cepa

DH5 α (pPAS1), para prosseguir com a subclonagem no vetor suicida pJP5603. Assim, o plasmídeo pPAS1 foi extraído da cepa DH5 α (pPAS1) e submetido à digestão com a enzima de restrição *EcoRI* para liberação do fragmento *afpA*₁ contendo os sítios para *EcoRI* (**Figura 25**). Esse fragmento foi utilizado na ligação com o vetor pJP5603.

Figura 25 - Perfil de restrição do plasmídeo pPAS1 da cepa DH5 α (pPAS1) com a enzima de restrição *EcoRI*



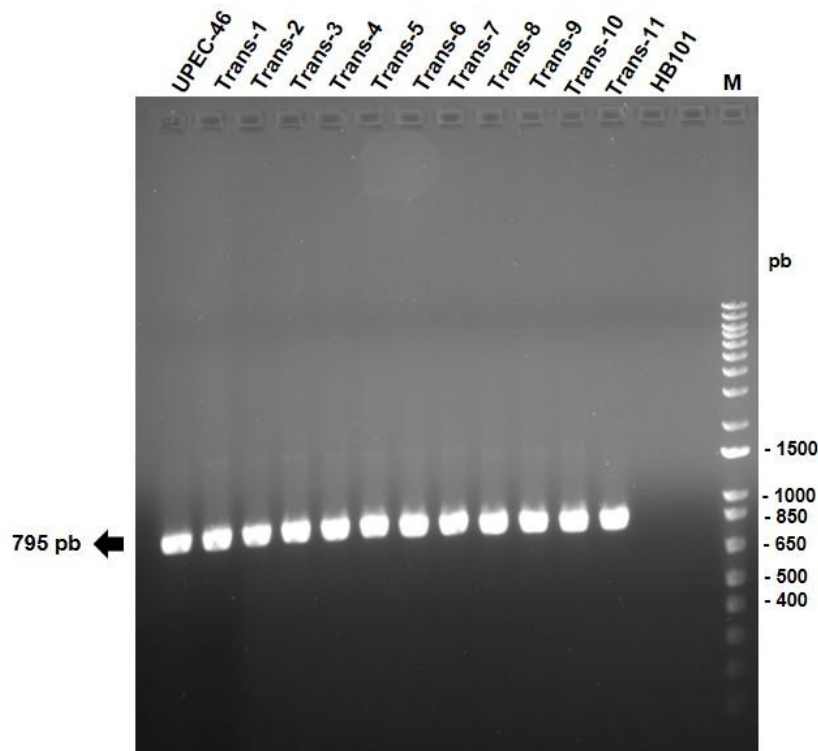
Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado por *UniSafe Dye* para análise do perfil de restrição com *EcoRI* da cepa DH5 α (pPAS1). A seta próxima ao tamanho de 300 pb indica o fragmento *afpA*₁, liberado após digestão, contendo os sítios de *EcoRI* e a seta próxima ao tamanho de 3 kb indica o vetor pGEM-T *Easy* obtido após digestão do plasmídeo pPAS1 com a enzima *EcoRI*. M: marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder* (Invitrogen).

Após a liberação do fragmento *afpA*₁ do plasmídeo pPAS1, este inserto foi ligado ao vetor pJP5603 digerido com *EcoRI*, gerando plasmídeo pPAS2. Após ligação, células eletrocompetentes de *E. coli* S17-1(λ pir) foram transformadas com pPAS2. Dez transformantes foram selecionados e confirmados quanto à correta clonagem com auxílio da PCR para detecção do fragmento *afpA*₁. Um desses transformantes foi selecionado e nomeado como cepa S17-1(λ pir) (pPAS2).

Após estas etapas, foi realizada a recombinação homóloga entre o plasmídeo pPAS2 da cepa doadora S17-1(λ pir) (pPAS2) com a cepa receptora UPEC-46 por meio do ensaio de conjugação. Onze transconjugantes foram selecionados e

confirmados por PCR quanto ao gene *afpB* para confirmar que se tratava da cepa UPEC-46 (Figura 26).

Figura 26 - Detecção do gene *afpB* nos transconjugantes selecionados



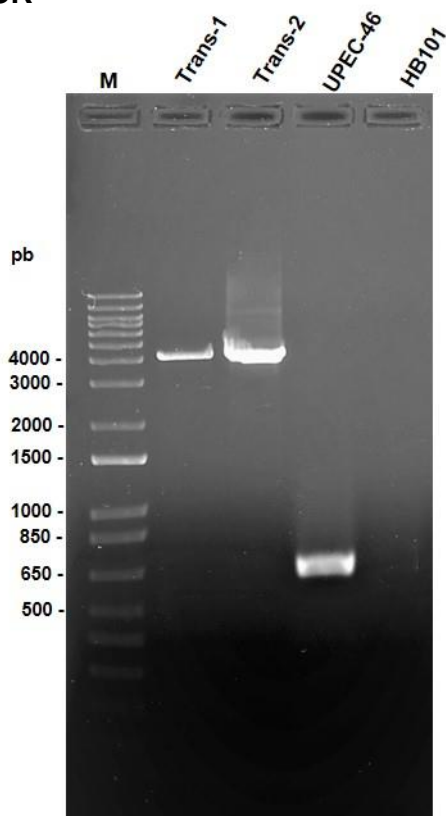
Eletroforese em gel de agarose (1%) corado por *UniSafe Dye* para análise do produto de amplificação do gene *afpB* nos 11 transconjugantes selecionados (Trans-1 a Trans-11). A cepa UPEC-46 foi utilizada como controle positivo e a cepa *E. coli* HB101 como controle negativo. Todos os transconjugantes analisados apresentaram positividade ao gene *afpB*. A seta indica o tamanho correto do gene *afpB* amplificado (795 pb). M: marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder* (Invitrogen).

A partir do resultado da PCR foram selecionados dois transconjugantes (trans-1 e trans-2), os quais foram submetidos a ensaios fenotípicos e genotípicos para confirmar a mutação no gene *afpA*. Ambos os transconjugantes apresentaram o perfil bioquímico de identificação presuntiva de *E. coli*.

Em seguida, a região correspondente ao gene *afpA* foi analisada por sequenciamento de nucleotídeos, usando como DNA molde as cepas transconjugantes (trans-1 e trans-2) e a cepa selvagem UPEC-46. Primeiramente, foram utilizados os iniciadores FwAfpAXhol e RvAfpAHindIII, na qual delimitam a região inicial e final do gene *afpA*, respectivamente. Uma reação de PCR foi realizada utilizando um ciclo maior de extensão (4 min) e a enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Invitrogen) com a finalidade de se amplificar um fragmento maior nas

cepas transconjugantes devido a recombinação homóloga e inserção do plasmídio pPAS2 no gene *afpA*. Com essa otimização foi possível obter um fragmento amplificado de ~4 kb para as cepas transconjugantes (**Figura 27**), o qual foi utilizado no sequenciamento com esses mesmos iniciadores.

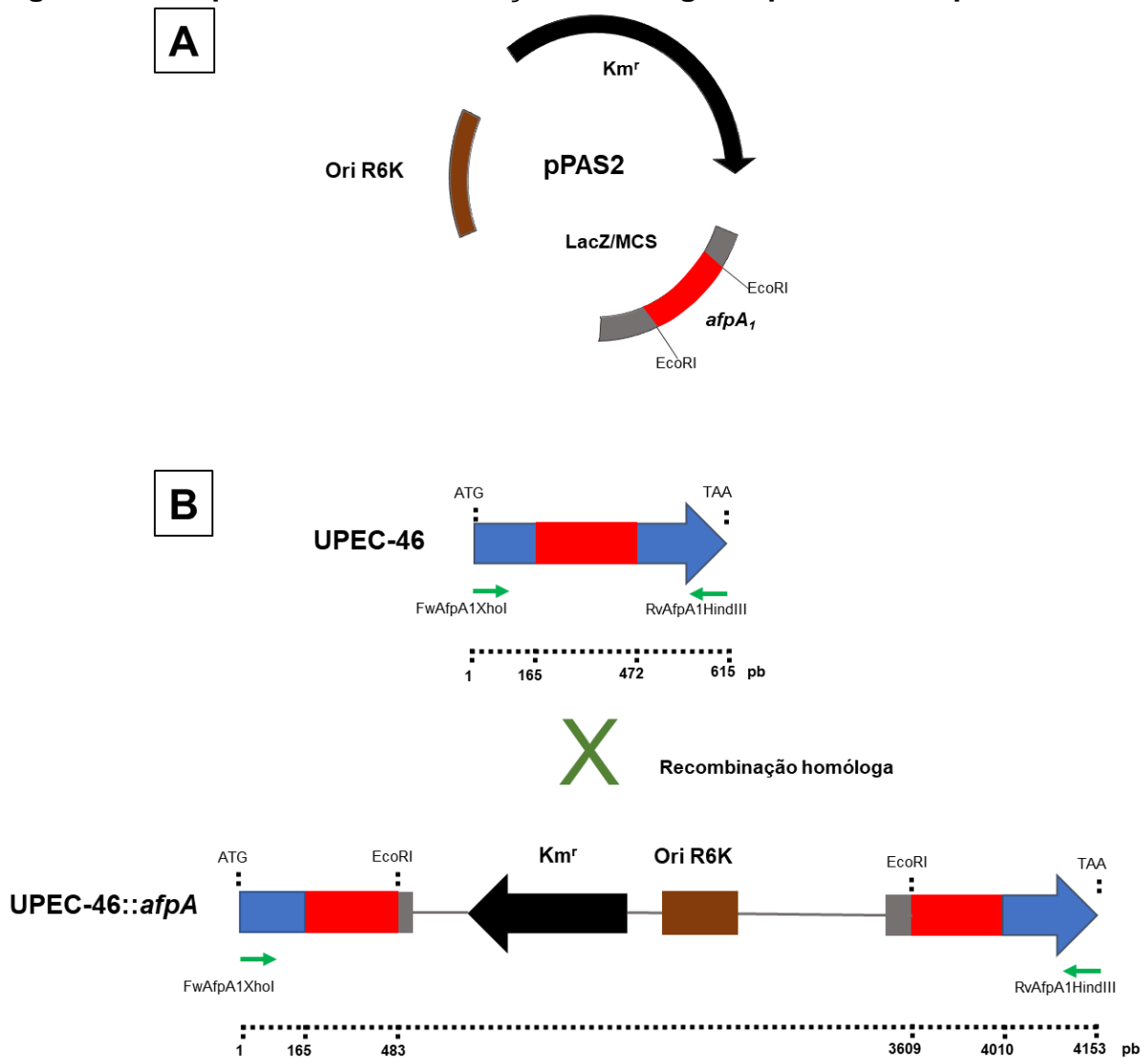
Figura 27 - Confirmação da recombinação homóloga nas cepas transconjugantes por PCR



Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado por solução de *Gel/Red* para análise do produto de amplificação do gene *afpA*, utilizando os iniciadores FwAfpAXhol e RvAfpAHindIII, nos dois transconjugantes (Trans-1 e Trans-2) e na cepa selvagem UPEC-46. Na cepa UPEC-46 houve amplificação apenas do gene *afpA* (~600 pb), enquanto para as cepas transconjugantes (Trans-1 e Trans-2) o produto de amplificação foi maior (~4,1 kb), correspondendo ao gene *afpA* recombinado com o plasmídio pPAS2. M: marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder* (Invitrogen).

Após a comprovação da mutação em *afpA* pelo sequenciamento de nucleotídeos, a cepa Trans-1 foi selecionada como a cepa mutante no gene *afpA* e nomeada como UPEC-46::*afpA*. Por fim, a **Figura 28** apresenta um esquema detalhado do vetor pPAS2 e conseqüentemente da recombinação homóloga com o gene *afpA* da cepa UPEC-46 para a obtenção do mutante UPEC-46::*afpA*.

Figura 28 - Esquema da recombinação homóloga de pPAS2 na cepa UPEC-46



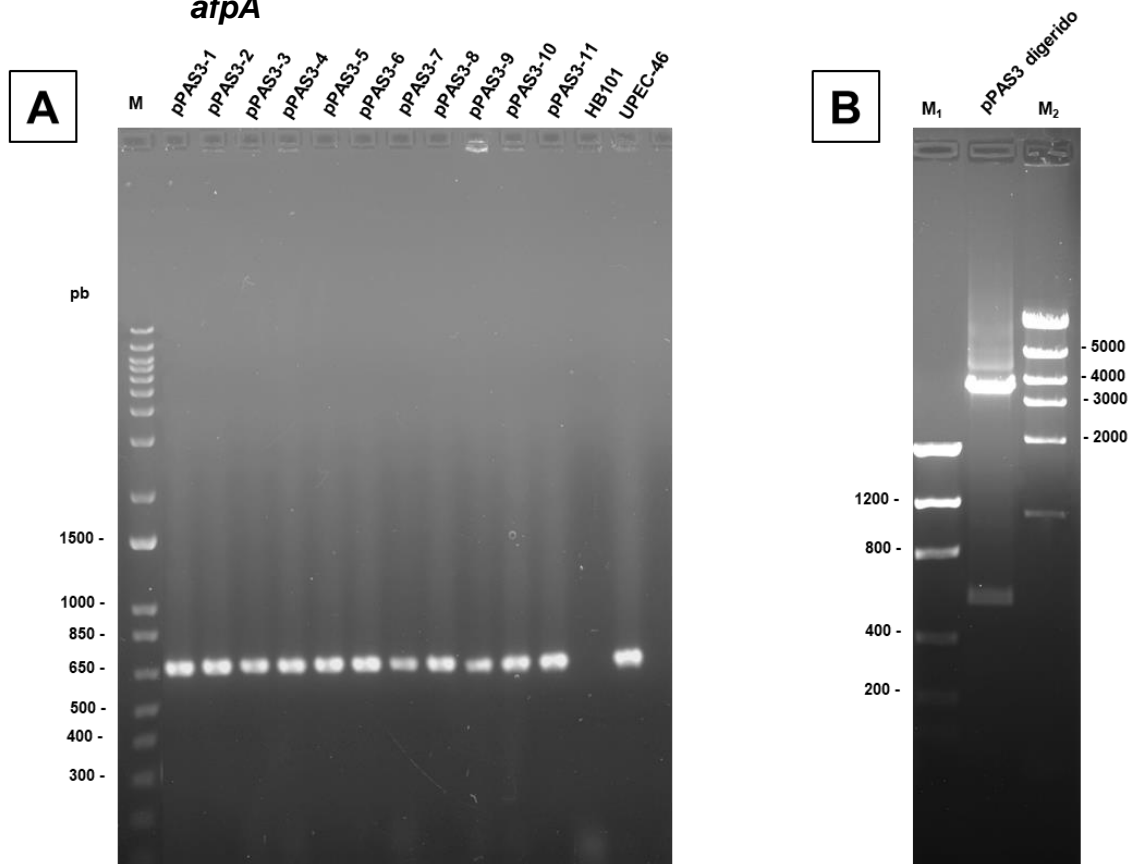
Esquema do plasmídio pPAS2 e da mutação apolar no gene *afpA* da amostra UPEC-46, baseado na recombinação homóloga entre pPAS2 e UPEC-46 para a geração do mutante UPEC-46::*afpA*. **(A)** Vetor pPAS2, correspondente ao vetor suicida pJP5603 com o fragmento interno do gene *afpA* (*afpA*₁; representado em vermelho) clonado no sítio de EcoRI do Sítio Múltiplo de Clonagem da região *lacZ* (representada em cinza). A região em preto corresponde ao cassete de resistência à canamicina (Km^r) e a região marrom corresponde a origem de replicação plasmidial (Ori R6K). **(B)** Esquema linear da inserção de pPAS2 no gene *afpA* da cepa UPEC-46. Na cepa UPEC-46 o gene *afpA* está representado em azul e o fragmento interno *afpA*₁ em vermelho. Houve a amplificação de um fragmento de 615 pb após a PCR utilizando os iniciadores FwAfpAXhoI e RvAfpAHindIII (setas verdes). ATG e TAA correspondem ao *start* e *stop codon* do gene *afpA*, respectivamente. Após a recombinação homóloga, houve a obtenção da cepa mutante UPEC-46::*afpA* na qual estão representados o gene *afpA* juntamente com partes do plasmídio pPAS2. Houve a amplificação de um fragmento de 4.153 pb após a PCR utilizando os iniciadores FwAfpAXhoI e RvAfpAHindIII, confirmando a correta mutação, uma vez que esse *amplicon* corresponde à junção do vetor pPAS2 e a sequência do gene *afpA* da cepa selvagem UPEC-46.

4.4.2 Construção da cepa complementada em *afpA*

Confirmada a mutação por sequenciamento do gene *afpA* na cepa UPEC-46::*afpA*, esta foi selecionada para a continuidade dos experimentos, que consistiu na complementação da mutação utilizando o vetor pACYC177.

Inicialmente o gene *afpA* foi amplificado utilizando os iniciadores FwAfpAXhoI e RvAfpAHindIII, digerido com XhoI e HindIII, e clonado nos sítios de restrição correspondentes no plasmídeo pACYC177, gerando o plasmídeo pPAS3. Este plasmídeo foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5 α . Dez clones resultantes da transformação foram investigados por PCR, sendo todos positivos para *afpA* (**Figura 29A**). A confirmação da construção de pPAS3 foi realizada por análise de restrição, após a digestão da extração plasmidial de um destes clones recombinantes (clone pPAS3-1) com as enzimas XhoI e HindIII, na qual o tamanho do fragmento liberado correspondeu com o gene *afpA*, conforme demonstrado pela **Figura 29B**.

Figura 29 - Construção do plasmídeo de complementação para a mutação no gene *afpA*



Eletróforese em gel de agarose (0,8%) corado com *UniSafe Dye*. **(A)** Produtos de amplificação para o gene *afpA* dos 11 clones transformantes (pPAS3-1 a pPAS3-11) para o plasmídeo pPAS3. A cepa UPEC-46 foi utilizada como controle positivo e a cepa *E. coli* HB101 como

controle negativo. Todos os clones analisados apresentaram positividade ao gene *afpA*. **(B)** Plasmídio extraído do clone pPAS3-1 digerido com enzimas de restrição XhoI e HindIII. Note a liberação de um fragmento com ~650 pb correspondente ao tamanho do produto de amplificação para o gene *afpA*. M: marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder* (Invitrogen). M₁: marcador de peso molecular *Low Mass DNA ladder* (Invitrogen). M₂: marcador de peso molecular *High Mass DNA ladder* (Invitrogen).

Por fim, a análise do sequenciamento de nucleotídeos foi possível confirmar a correta clonagem e ausência de mutações no inserto do plasmídio pPAS3. Em seguida, o pPAS3 foi extraído e a construção UPEC-46::*afpA* foi então transformada com este plasmídio e os transformantes selecionados em LBA contendo canamicina e ampicilina. Assim, a cepa resultante da complementação foi nomeada de UPEC-46::*afpA* (pPAS3).

4.4.3 Análise da interação com células epiteliais *in vitro*

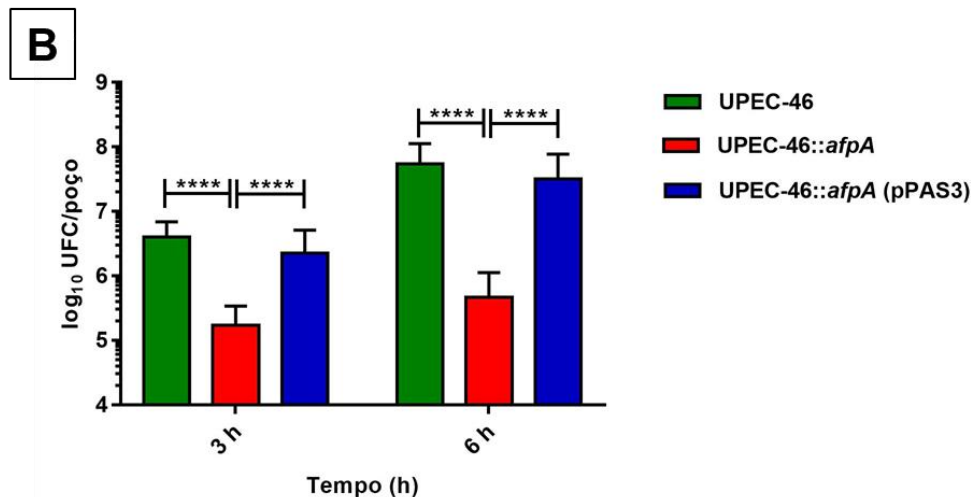
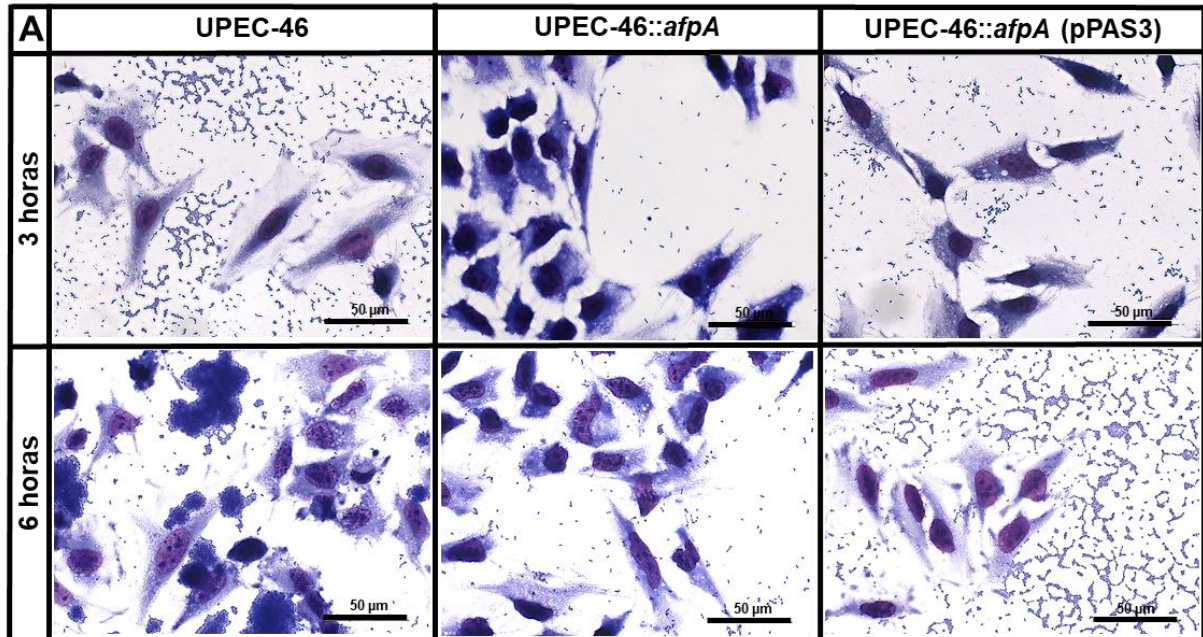
A cepa selvagem (UPEC-46), seu mutante isogênico em *afpA* (UPEC-46::*afpA*) e o correspondente mutante complementado (UPEC-46::*afpA* (pPAS3)), foram analisados quanto à aderência em células HeLa, HT-29 e 5637, usando os ensaios de aderência qualitativos e quantitativos na presença de 1% D-manose.

No ensaio qualitativo de adesão, a quantidade de bactérias aderidas foi visualmente superior nas cepas UPEC-46 e UPEC-46::*afpA* (pPAS3), quando comparadas com cepa mutante em *afpA* (UPEC-46::*afpA*) em todas as linhagens celulares avaliadas (**Figura 30A, 31A e 32A**).

Analisando o ensaio quantitativo, a cepa UPEC-46::*afpA* exibiu uma diminuição significativa da aderência em todas as linhagens celulares e tempos analisados (3 e 6 h), quando comparada com as cepas UPEC-46 e UPEC-46::*afpA* (pPAS3) ($P < 0,0001$). A cepa complementada em *afpA* restabeleceu a adesão em todas as condições testadas, com quantidade bacteriana significativamente semelhante quando comparado à cepa UPEC-46 (**Figura 30B, 31B e 32B**).

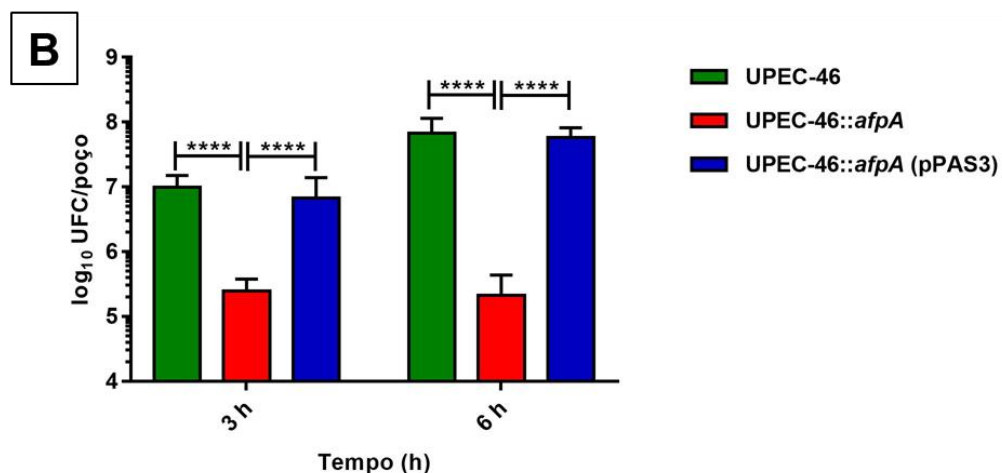
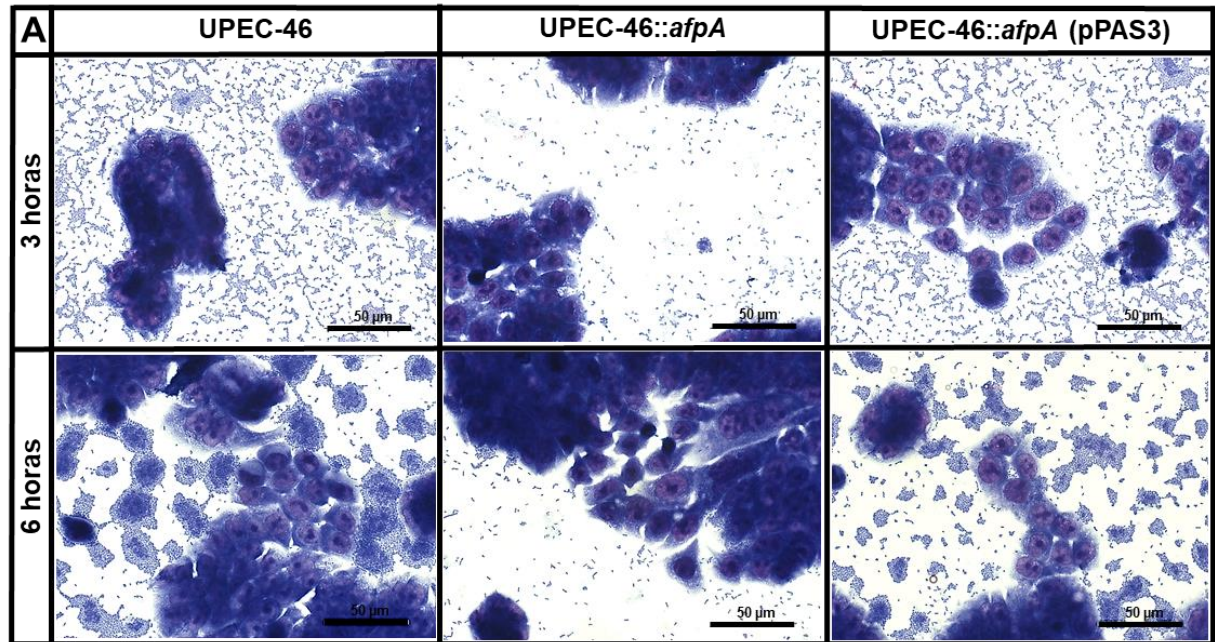
Dessa forma, ficou evidenciado que o produto do gene *afpA* é necessário para a aderência bacteriana na cepa UPEC-46, sendo esses resultados observados em diferentes linhagens celulares (HeLa, HT-29 e 5637) e tempos de infecção (3 e 6 h).

Figura 30 – Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA* e UPEC-46::*afpA* (pPAS3) em células HeLa na presença de D-manose



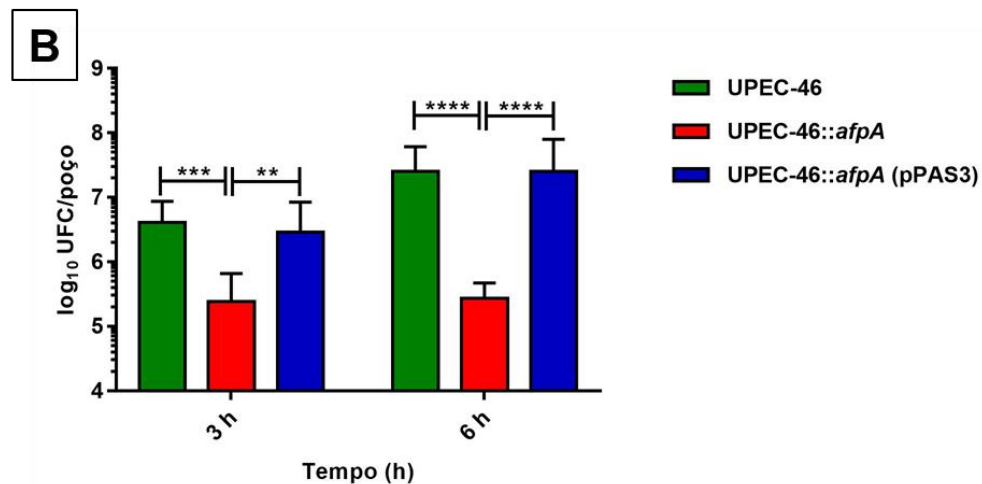
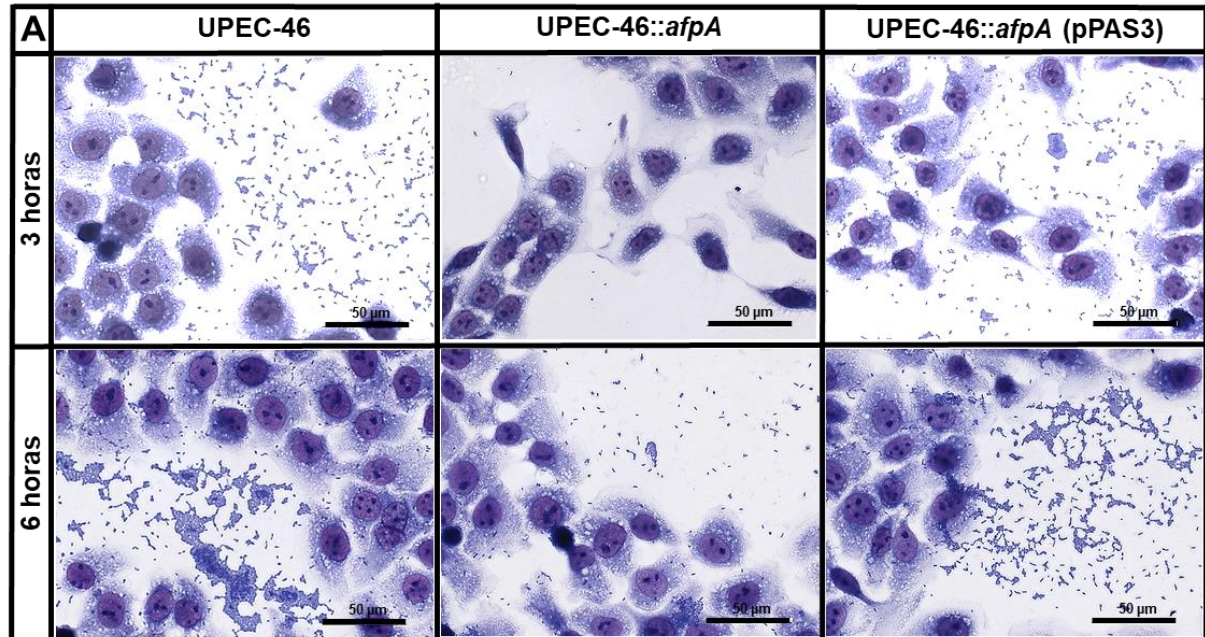
(A) Para os ensaios de adesão qualitativas as células HeLa foram infectadas por períodos de 3 ou 6 h, na presença de 1% D-manose. Após o período de infecção, as células foram fixadas, coradas com as soluções corante May-Grünwald/Giemsa e observadas em microscópio ótico comum. Barras= 50 µm. **(B)** Para os ensaios de adesão quantitativas às células HeLa foram infectadas (MOI = 100) por períodos de 3 ou 6 h, na presença de 1% D-manose. Após o período de infecção e lise com Triton-X-100 diluído a 1% em PBS 1X, a quantificação da adesão ocorreu em placas de ágar MC. Os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica e os dados apresentados consistem na média ± desvio padrão, sendo expressos em log₁₀ UFC/poço. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os resultados obtidos nesse experimento (****, $P < 0,0001$).

Figura 31 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA* e UPEC-46::*afpA* (pPAS3) em células HT-29 na presença de D-manose



(A) Para os ensaios de adesão qualitativas às células HT-29 foram infectadas por períodos de 3 ou 6 h, na presença de 1% D-manose. Após o período de infecção, as células foram fixadas, coradas com as soluções corante May-Grünwald/Giemsa e observadas em microscópio ótico comum. Barras= 50 µm. (B) Para os ensaios de adesão quantitativas às células HT-29 foram infectadas (MOI = 100) por períodos de 3 ou 6 h, na presença de 1% D-manose. Após o período de infecção e lise com Triton-X-100 diluído a 1% em PBS 1X, a quantificação da adesão ocorreu em placas de ágar MC. Os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica e os dados apresentados consistem na média \pm desvio padrão, sendo expressos em \log_{10} UFC/poço. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os resultados obtidos nesse experimento (****, $P < 0,0001$).

Figura 32 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA* e UPEC-46::*afpA* (pPAS3) em células 5637 na presença de D-manose



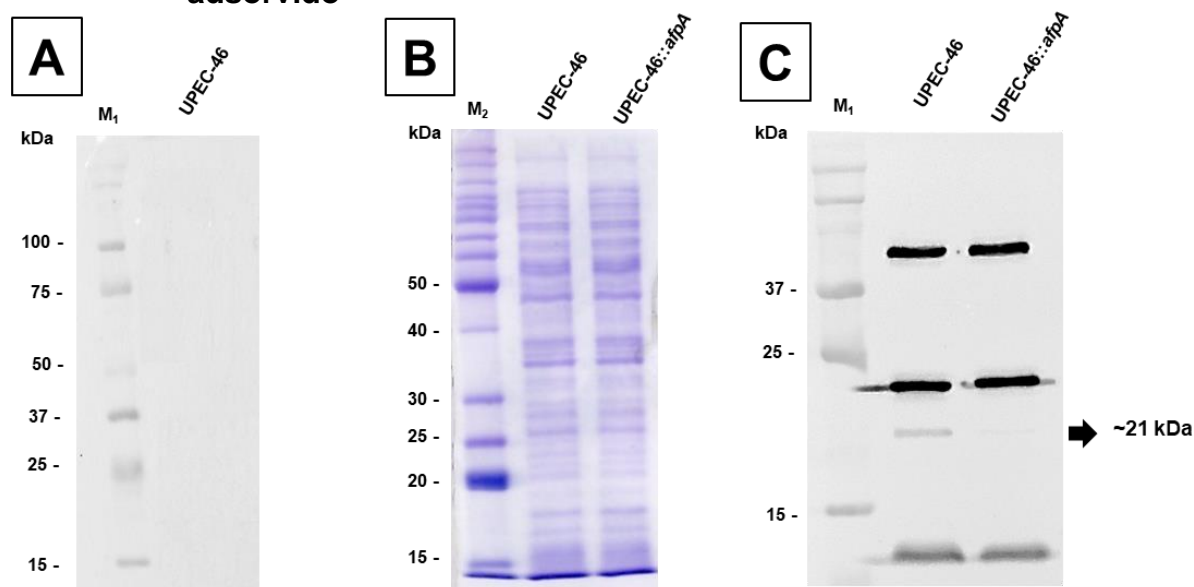
(A) Para os ensaios de adesão qualitativas às células 5637 foram infectadas por períodos de 3 ou 6 h, na presença de 1% D-manose. Após o período de infecção, as células foram fixadas, coradas com as soluções corante May-Grünwald/Giemsa e observadas em microscópio ótico comum. Barras= 50 µm. (B) Para os ensaios de adesão quantitativas às células 5637 foram infectadas (MOI = 100) por períodos de 3 ou 6 h, na presença de 1% D-manose. Após o período de infecção e lise com Triton-X-100 diluído a 1% em PBS 1X, a quantificação da adesão ocorreu em placas de ágar MC. Os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica e os dados apresentados consistem na média ± desvio padrão, sendo expressos em log₁₀ UFC/poço. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os resultados obtidos nesse experimento (**, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

4.5 Análise ultraestrutural de AFP

4.5.1 Avaliação por immunoblotting do soro anti-AFP

Uma vez demonstrada a importância da adesina AFP na aderência a diferentes linhagens celulares eucarióticas, a ultraestrutura de AFP foi analisada por microscopia eletrônica. Para isso, primeiramente, o soro anti-UPEC-46 foi produzido e adsorvido contra a cepa mutante em *afpA* (UPEC-46::*afpA*). Após a adsorção, a reatividade dos soros pré-imune e anti-UPEC-46 adsorvido foram verificados por *immunoblotting*. Analisando os resultados obtidos, observou-se que não houve reatividade do soro pré-imune ao extrato total de proteínas da cepa UPEC-46 (**Figura 33A**). Analisando o soro anti-UPEC-46 adsorvido, foi observado a presença de uma banda com peso molecular semelhante a proteína pilina principal (AfpA), com peso molecular próximo a 21 kDa na cepa selvagem (**Figura 33C**). Concomitantemente, essa mesma banda não foi visível na cepa mutante em *afpA* (**Figura 33C**). Portanto, esses resultados sugerem fortemente a especificidade do soro anti-UPEC-46 adsorvido para a detecção da proteína AfpA e, conseqüentemente, para a detecção da adesina AFP. Este soro foi denominado anti-AFP.

Figura 33 - Análise por *immunoblotting* dos soros pré-imune e anti-UPEC-46 adsorvido



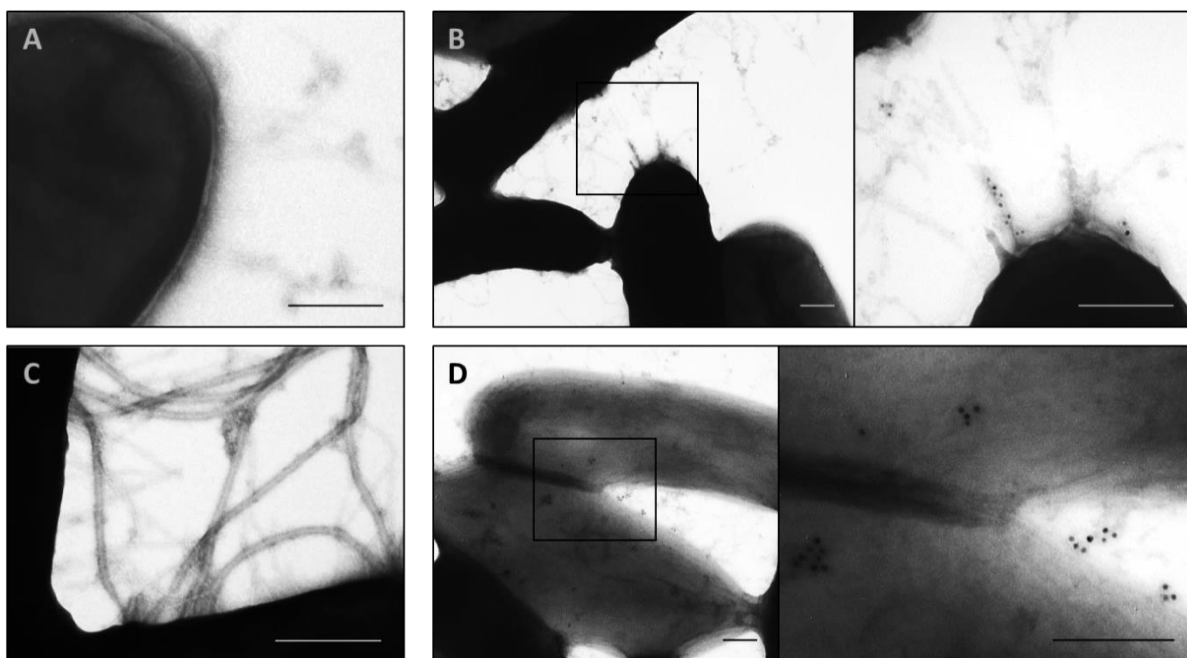
(A) Imunodeteção do extrato total de proteínas da cepa selvagem (UPEC-46) com o soro pré-imune (controle negativo). **(B)** Extrato total de proteínas das cepas UPEC-46 e UPEC-46::*afpA* analisados por SDS-PAGE (12%) corado com *Coomassie Brilliant Blue G250*. **(C)** Imunodeteção do extrato total de proteínas da cepa selvagem (UPEC-46) e mutante em *afpA*

(UPEC-46::*afpA*) com o soro anti-UPEC-46 adsorvido. Para as imunodeteções, após corrida eletroforética (SDS-PAGE a 12%), o conteúdo foi transferido para uma membrana de nitrocelulose pela técnica de *Western Blotting*, seguido do *immunoblotting* com o soro policlonal pré-imune ou anti-UPEC-46 adsorvido, na diluição de 1:500, e revelação pelo sistema de quimioluminescência ECL. M₁ – marcador de massa molecular *Precision Plus Kaleidoscope Protein™* (Bio-Rad). M₂: marcador de massa molecular *BenchMark* (Thermo).

4.5.2 Identificação das estruturas de superfície bacteriana reconhecidas pelo soro anti-UPEC-46 adsorvido

Após os testes de *immunoblotting*, a análise ultraestrutura de AFP foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão com imunomarcagem com os soros anti-AFP (anticorpo primário) e anti-IgG de coelho conjugado a ouro coloidal 10 nm (anticorpo secundário). Foi possível observar estruturas fimbriais finas reagindo com o soro anti-AFP associado à bactéria selvagem e a cepa complementada (**Figura 34B** e **Figura 34D**). As células de UPEC-46::*afpA* preparadas de forma idêntica não apresentaram estruturas fimbriais finas reativas (**Figura 34C**). Não houve reatividade do soro pré-imune contra as células UPEC-46 (**Figura 34A**). Embora a marcação tenha sido fraca, essa foi consistente em três diferentes experimentos realizados.

Figura 34 - MET com imunomarcagem com os soros pré-imune e anti-AFP



(A) Cepa selvagem UPEC-46 marcada com soro pré-imune (controle negativo). Cepas (B) UPEC-46, (C) mutante em *afpA* (UPEC-46::*afpA*) e (D) complementada (UPEC-46::*afpA* (pPAS3)), marcadas com o soro anti-AFP. Em todas as imunomarcações, após incubação com os soros (anticorpos primários), as bactérias foram incubadas com o anticorpo

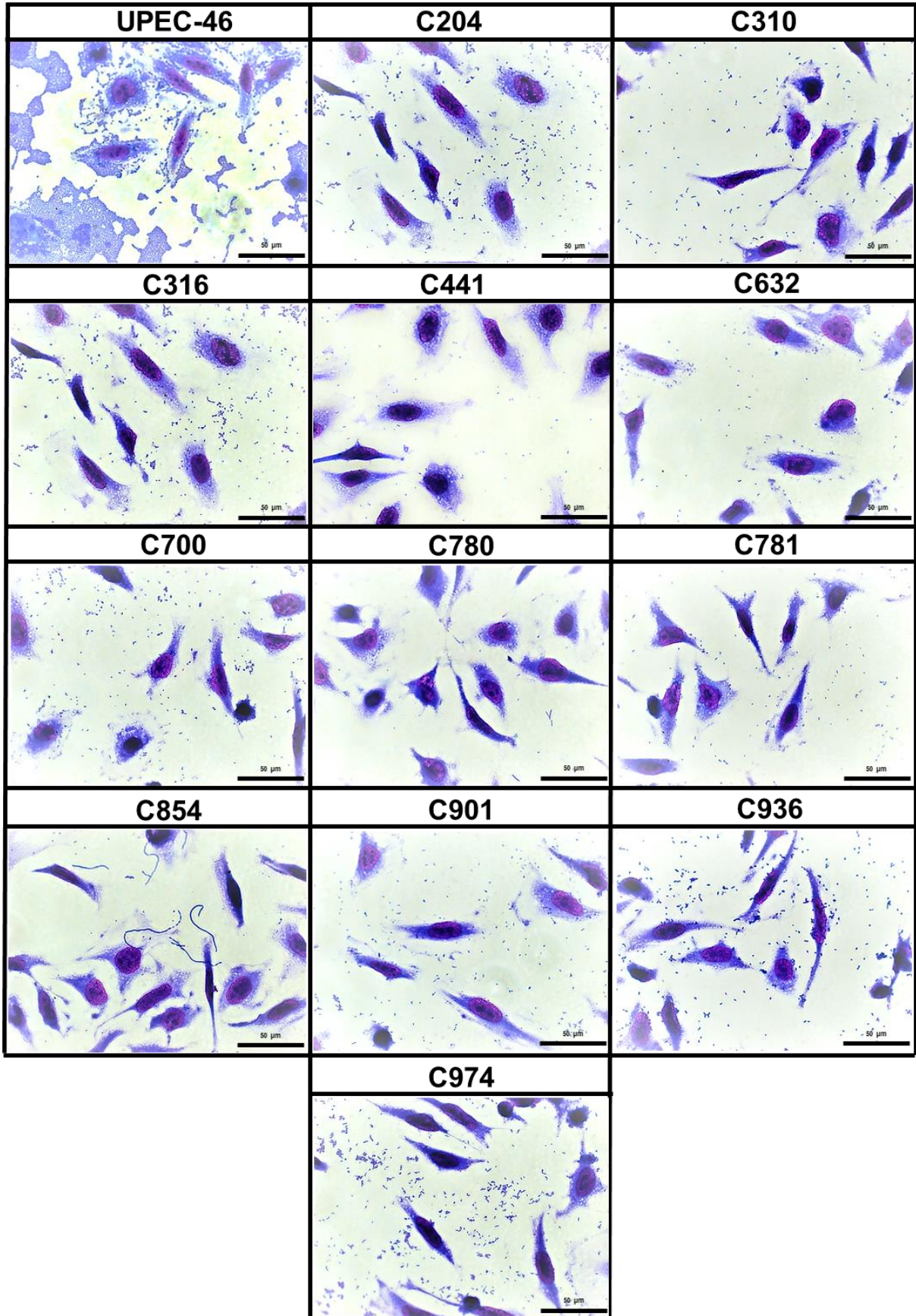
secundário anti-IgG de coelho marcado com partículas de ouro (10 nm), contrastadas com acetato de uranila a 2% em água, e observadas em MET. Barras, 200 nm.

4.6 Pesquisa das adesinas associadas ao fenótipo AA na biblioteca de mutantes *EZ-Tn5*

4.6.1 Identificação dos genes envolvidos no fenótipo AA

Com o objetivo de identificar novos fatores de virulência envolvidos no fenótipo AA, o *transposon EZ-Tn5 <R6K_{Yori}/KAN-2>* foi empregado para a construção de uma biblioteca de mutantes a partir da cepa UPEC-46. Foram selecionadas 1.040 colônias que apresentavam resistência a canamicina, sendo 540 colônias obtidas em uma primeira eletroporação e 500 colônias na segunda. Todas as colônias da biblioteca da biblioteca de mutantes foram denominadas de clones e numeradas de acordo com a ordem de isolamento. Os clones da biblioteca de mutantes foram inicialmente testados quanto à adesão em células HeLa em ensaios de 6 h de infecção usando microplacas de 48 poços, na qual foram identificados 12 clones apresentando ausência do fenótipo AA. Esses clones foram novamente avaliados fenotipicamente por meio do teste qualitativo de adesão em células HeLa (6 h de infecção) usando microplacas de 24 poços com lamínulas, onde a ausência do fenótipo AA e uma redução visual em quantidade de bactérias aderidas foram observados em todos os 12 clones, conforme demonstrado na **Figura 35**.

Figura 35 - Perfis de adesão às células HeLa dos mutantes selecionados da biblioteca EZ-Tn5



Para os ensaios de adesão as células HeLa foram infectadas por 6 h com os mutantes que perderam a capacidade de adesão agregativa, na presença de 1% D-manose, fixadas, coradas com as soluções corante May-Grünwald/Giemsa e observadas em microscópio ótico comum. A cepa UPEC-46 foi utilizada como controle positivo do fenótipo AA. Barras= 50 µm.

Todos os 12 clones obtidos foram submetidos a experimentos de clonagem da região que flanqueia a inserção do *transposon*, sequenciamento e análise das sequências obtidas para a identificação dos genes envolvidos no fenótipo agregativo. Para isso o DNA genômico de cada mutante foi extraído e submetido a digestão com KpnI, EcoRI ou NdeI e, posteriormente ligado. A mistura de ligação foi transformada em *E. coli* DH5α (λ pir) e os clones selecionados em LBA com canamicina. A seguir, o DNA plasmidial foi extraído e submetido ao sequenciamento de nucleotídeos por meio dos iniciadores KAN-2 FP-1 e R6KAN-2 RP-1.

A análise da sequência do DNA flanqueado pela inserção do *transposon* nos 12 clones pelo *BLASTn* levou à identificação de diferentes genes classificados em três categorias, compreendendo inserções em genes associados a síntese de lipopolissacarídeos (LPS), genes relacionados ao metabolismo/transportadores celulares e associados à adesinas. A **Tabela 10** apresenta o local de inserção, bem como a função dos diferentes genes identificados para cada clone negativo ao fenótipo AA.

Tabela 10 - Locais de inserção, grupos e função das inserções dos clones negativos ao fenótipo AA

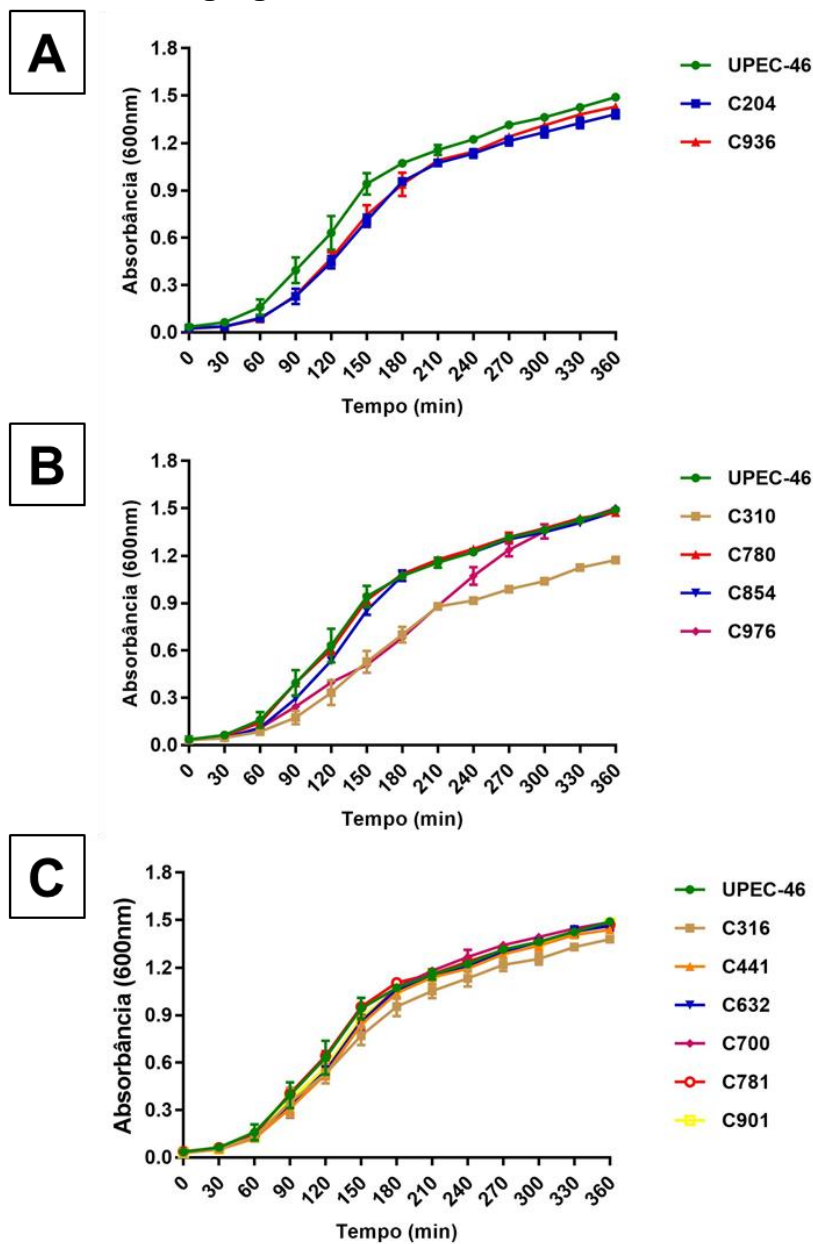
Clone	Local de inserção	Grupo	Função
C204	<i>rfaG</i> – Glicosiltransferase I	LPS	Montagem do LPS
C310	<i>yahK</i> – Aldeído redutase	Metabolismo	Redução de álcool em aldeído
C316	<i>afpP</i> - Prepilina peptidase	Adesina	Montagem do AFP
C441	<i>fimI</i> - Proteína fímbria I	Adesina	Montagem da fímbria tipo 1
C632	<i>afpB</i> - Lipoproteína Secretina	Adesina	Montagem do AFP
C700	<i>afpE</i> - Proteína de membrana interna	Adesina	Montagem do AFP
C780	<i>pyrB</i> - Aspartato carbamoiltransferase	Metabolismo	Formação de fosfato inorgânico
C781	<i>afpB</i> - Lipoproteína Secretina	Adesina	Montagem do AFP
C854	<i>nhaA</i> - Antiportador Na/H	Transporte	Regulação do pH interno
C901	<i>afpD</i> - Proteína de ligação ao DNA	Adesina	Montagem do AFP
C936	<i>rfaL</i> – Ligase do antígeno O	LPS	Montagem do LPS
C976	<i>pfkL</i> - Fosfofrutoquinase	Metabolismo	Via da glicólise

As análises ocorreram por meio da ferramenta *BLASTn* utilizando a cepa UPEC-46 como sequência de consulta.

4.6.2 Caracterização fenotípica dos mutantes

Após a identificação dos locais de inserção nos 12 diferentes clones analisados, esses foram caracterizados fenotipicamente quanto às curvas de crescimento e teste de motilidade em meio LB (0,3% ágar), para se verificar se as mutações haviam alterado esses fenótipos. Esses resultados estão apresentados na **Figura 36** e **Figura 37**.

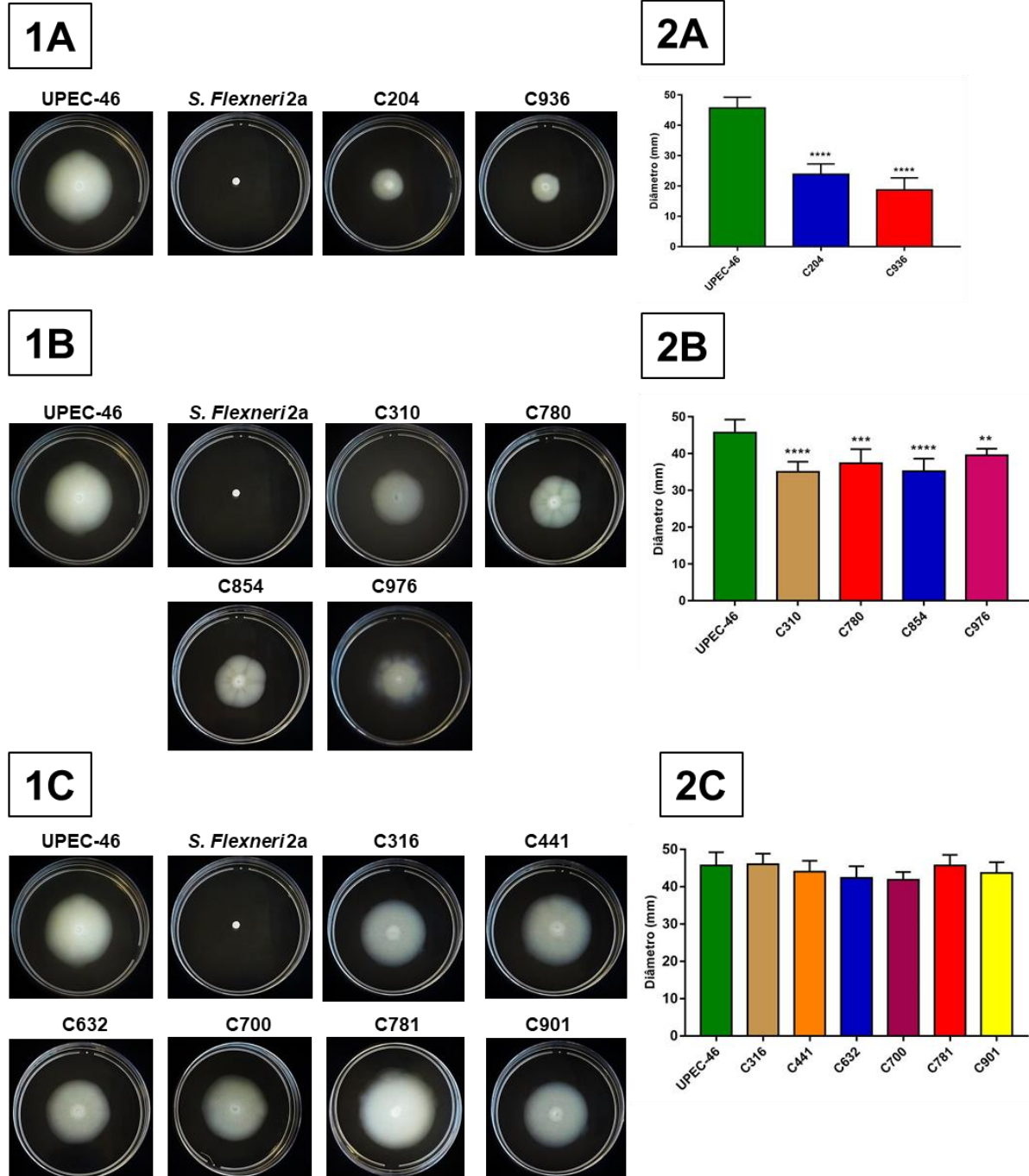
Figura 36 - Curvas de crescimento dos mutantes que perderam a capacidade de adesão agregativa



Os valores de DO_{600} foram registrados a cada 30 min durante o cultivo das cepas em caldo LB a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 6 h. Os dados representam a média \pm desvio padrão

das triplicatas biológicas. **(A)** mutantes com inserções do *transposon* em genes associados a síntese de LPS; **(B)** mutantes em genes associados ao metabolismo/sistema de transporte; **(C)** mutantes em genes relacionados a adesinas.

Figura 37 - Ensaio de motilidade dos mutantes que perderam a capacidade de adesão agregativa



Ensaio de motilidade para a UPEC-46 e mutantes que perderam a capacidade de adesão agregativa. A cepa bacteriana *Shigella flexneri 2a* foi utilizada como controle negativo de motilidade. **(1)** Motilidade das cepas em meio LB (0,3% de ágar); **(2)** medida do diâmetro do halo de motilidade em milímetros. Os dados representam a média \pm desvio padrão das duplicatas técnicas e triplicatas biológicas. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett foi usado para comparar os resultados das cepas mutantes à cepa UPEC-46 (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****,

$P < 0,0001$). **(A)** mutantes com inserções do *transposon* em genes associados a síntese de LPS; **(B)** mutantes em genes associados ao metabolismo/sistema de transporte; **(C)** mutantes em genes relacionados a adesinas.

Para os mutantes com inserção em genes relacionados ao LPS a curva de crescimento mostrou um perfil semelhante entre a linhagem parental (UPEC-46) e os mutantes (clones C204 e C936). Já para os mutantes em inserções em genes relacionados ao metabolismo/sistema de transporte as alterações mais visíveis na curva de crescimento ocorrem nos mutantes C310 (aldeído redutase) e C976 (fosfofrutoquinase).

Quanto à motilidade, houve uma diminuição significativa no diâmetro do halo quando comparado com os mutantes em genes relacionados ao metabolismo/sistema de transporte ($P < 0,01$), e nos mutantes C204 e C936 na qual estão os genes *rfaL* e *rfaG* relacionados a síntese de LPS ($P < 0,0001$).

Ao analisar as inserções em genes relacionados a adesinas, pôde-se constatar que a fímbria tipo 1 e o *pilus* AFP desempenharam papel fundamental no estabelecimento da adesão agregativa. Foi observado que os clones dessa categoria apresentaram o mesmo perfil de crescimento e valores de motilidade significativamente semelhantes a cepa UPEC-46. Estes resultados indicam que inserções em genes da adesina AFP e da fímbria tipo 1 não afetaram o crescimento e motilidade quando comparado a cepa UPEC-46, aspectos que poderiam influenciar no estudo da patogênese destes fatores de virulência.

Por fim, foi analisada a influência destas mutações na expressão da fímbria tipo 1 utilizando o ensaio de aglutinação na presença e na ausência de D-manose. Com exceção do clone C441, na qual a inserção ocorreu no gene *fimI*, todos os demais foram capazes de aglutinar na ausência de D-manose, demonstrando que as inserções do *transposon* contidas nos clones analisados não afetam a expressão desta fímbria. A **Tabela 11** apresenta os resultados obtidos neste ensaio.

Tabela 11 – Capacidade de aglutinação da cepa UPEC-46 e dos clones negativos ao fenótipo AA

Cepas	Aglutinação em <i>S. cerevisiae</i>	
	Ausência de D-manose	Presença de 2% D-manose
UPEC-46	+	-
C204	+	-
C310	+	-
C316	+	-
C441	-	-
C632	+	-
C700	+	-
C780	+	-
C781	+	-
C854	+	-
C901	+	-
C936	+	-
C976	+	-

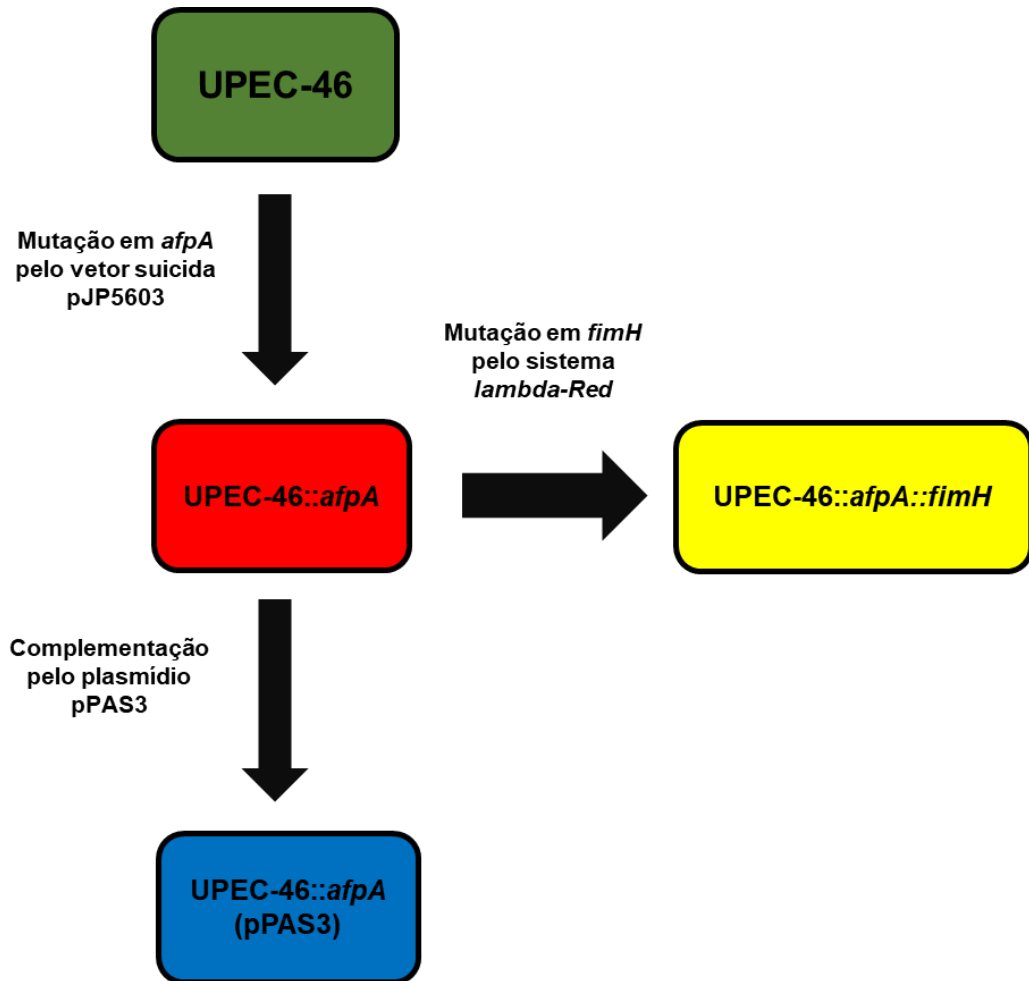
A capacidade de aglutinação em *S. cerevisiae* foi avaliada como positiva (+) ou negativa (-).

4.7 Papel das adesinas associadas ao fenótipo AA na patogênese da amostra UPEC-46

Posteriormente à análise da biblioteca de mutantes e identificação das adesinas AFP e fímbria tipo 1 envolvidas no fenótipo AA da cepa UPEC-46, foi analisado o papel específico destas adesinas na adesão e invasão *in vitro* e na capacidade de colonização de órgãos do trato urinário e intestinal *in vivo*. Para tal, primeiramente, construções a partir da manipulação genética da UPEC-46 foram avaliadas de modo a entender o papel destes fatores de virulência tanto individualmente quanto em conjunto.

As construções UPEC-46::*afpA* e UPEC-46::*afpA* (pPAS3) foram obtidas conforme descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2, respectivamente. Um resumo das diferentes construções para a cepa UPEC-46 está sintetizado na **Figura 38**.

Figura 38 - Esquema das diferentes construções realizadas para análise do padrão AA na patogênese da cepa UPEC-46



As diferentes construções a partir da manipulação genética da UPEC-46 foram realizadas empregando-se diferentes metodologias de mutagênese e complementação. O mutante UPEC-46::*afpA* foi obtido a partir da inserção do vetor suicida pJP5603 no gene *afpA* da adesina AFP. A complementação do gene *afpA* (cepa UPEC-46::*afpA* (pPAS3)) foi realizada utilizando o plasmídeo pACYC177 contendo o gene *afpA* da cepa UPEC-46 (pPAS3). O duplo mutante nas adesinas AFP e fímbria tipo 1 (UPEC-46::*afpA*::*fimH*) foi obtido por meio da mutagênese do gene *fimH* na cepa UPEC-46::*afpA* utilizando o sistema λ Red.

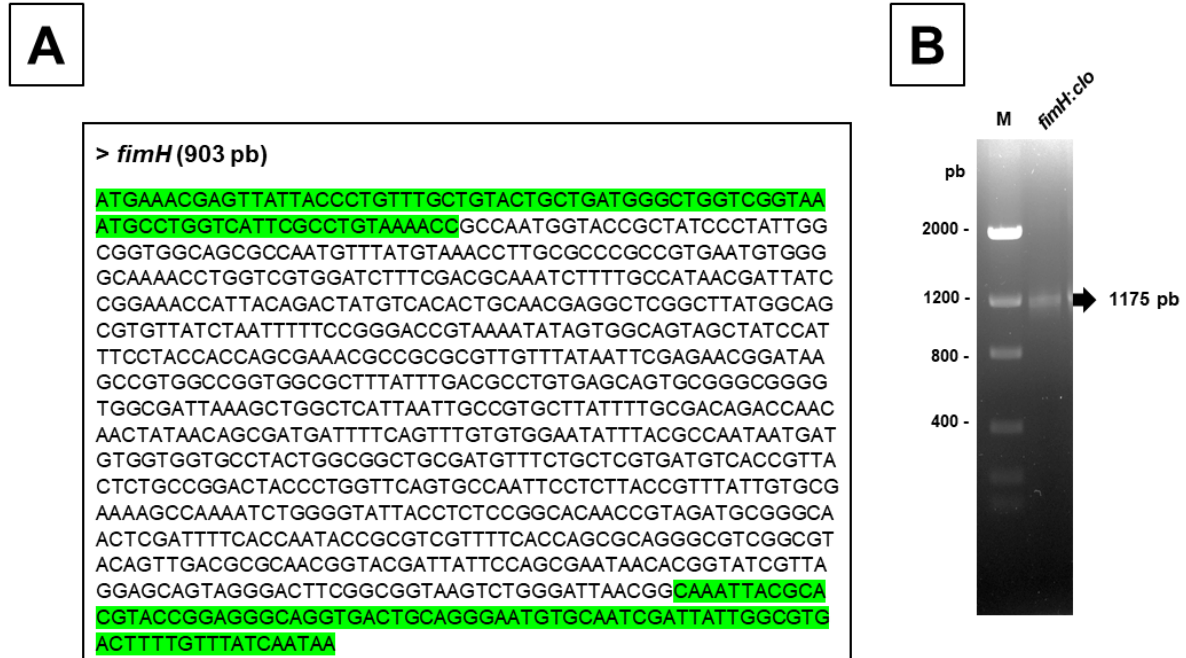
4.7.1 Construção da cepa duplo mutante pelo sistema λ Red

Para a mutagênese no gene *fimH*, a partir da cepa mutante em *afpA* (UPEC-46::*afpA*), e conseqüentemente a construção da cepa duplo mutante (*afpA* e *fimH*), foi utilizado o sistema de recombinases codificadas pelo fago λ Red (DATSENKO; WANNER, 2000).

Inicialmente, o fragmento *fimH:clo* de 1.175 pb foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores FwRedFimH e RvRedFimH, a partir do plasmídeo pKD3. Em seguida esse fragmento foi purificado e tratado com a endonuclease DpnI.

A sequência do gene *fimH*, bem como o produto da amplificação do fragmento *fimH:clo* estão representados na **Figura 39**.

Figura 39 - Gene *fimH* e produto da amplificação do fragmento *fimH:clo*



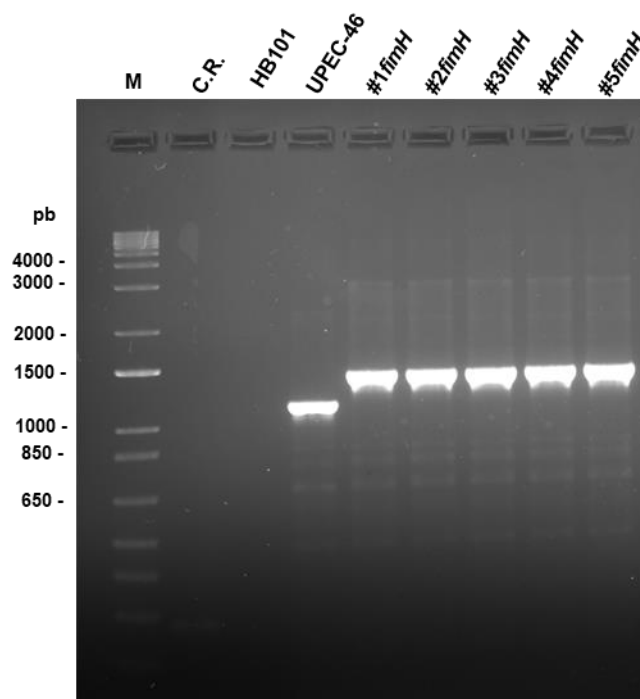
(A) Sequência completa do gene *fimH* de 903 pb na cepa UPEC-46. Em verde estão representados a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (FwRedFimH e RvRedFimH) homólogos ao gene para a amplificação do fragmento *fimH:clo* de 1.175 pb, a partir do plasmídio pKD3. **(B)** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com *UniSafe Dye* para o produto de amplificação do fragmento *fimH:clo*, a partir do plasmídio pKD3. A seta indica o tamanho correto do fragmento *fimH:clo* amplificado (1.175 pb). M: marcador de peso molecular *Low Mass DNA ladder* (Invitrogen).

Para que o processo de recombinação homóloga ocorresse de forma eficiente, a cepa UPEC-46::*afpA* foi inicialmente transformada por eletroporação para a incorporação do plasmídio pKOBEG-Apra. Posteriormente, o fragmento *fimH:clo* foi transformado por eletroporação em células competentes de UPEC-46::*afpA* expressando as recombinases codificadas pelo plasmídio pKOBEG-Apra. Os transformantes foram selecionados em LBA contendo canamicina e cloranfenicol.

Cinco candidatos a duplo mutante (colônias resistentes à canamicina e cloranfenicol) foram obtidos, e curados do plasmídio pKOBEG-Apra após quatro repiques sucessivos a 42 °C. Os possíveis candidatos a duplo mutante foram analisados quanto ao perfil bioquímico de identificação presuntiva de *E. coli*, com auxílio dos meios de identificação EPM, MILi e Citrato de Simons, mostrando que todos mantiveram as características bioquímicas da cepa UPEC-46::*afpA*.

Em seguida, a região correspondente ao gene *fimH* foi amplificada por PCR, usando como DNA molde os cinco candidatos a duplo mutante (#1*fimH* a #5*fimH*) e a cepa selvagem UPEC-46. Foram utilizados os iniciadores FimH-Fw e FimH-Rv, os quais delimitam a região *upstream* e *downstream* do gene *fimH*, respectivamente. Essa PCR foi realizada com a finalidade de amplificar um fragmento maior nas cepas candidatas a duplo mutante devido a recombinação homóloga e inserção do fragmento *fimH:clo* correspondente ao cassete de resistência a cloranfenicol. Com a realização dessa PCR foi possível obter um fragmento amplificado maior (~1,4 kb) para os cinco candidatos a duplo mutante avaliados (**Figura 40**), indicando a incorporação do cassete de recombinação.

Figura 40 - Confirmação da recombinação homóloga por PCR no gene *fimH*



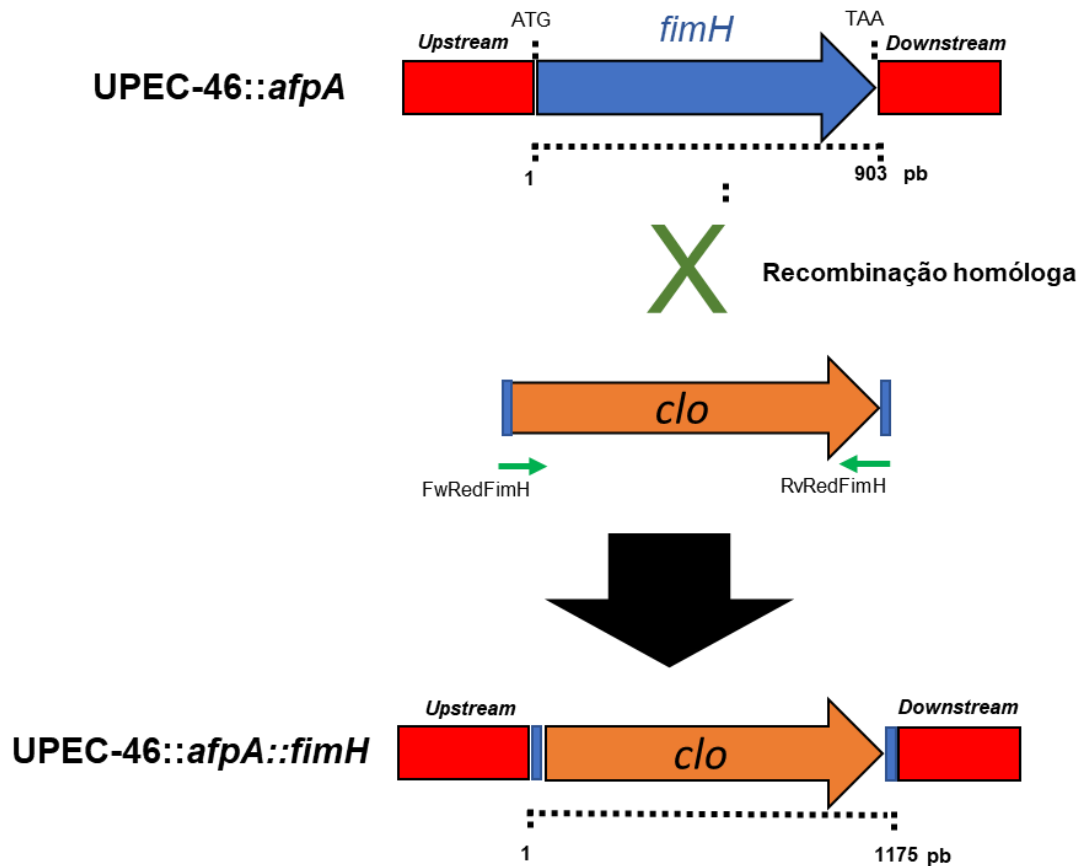
Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com *UniSafe Dye* para análise do produto de amplificação correspondente as regiões *upstream* e *downstream* do gene *fimH*, utilizando os iniciadores FimH-Fw e FimH-Rv, para as cinco cepas transformantes (#1*fimH* a #5*fimH*). Na cepa UPEC-46 houve amplificação apenas do gene *fimH* e regiões adjacentes correspondendo a 1.122 pb. Já para as cepas transformantes (#1*fimH* a #5*fimH*) o produto de amplificação foi maior (~1,4 kb), correspondendo ao fragmento *fimH:clo* recombinado no gene *fimH*. M: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Em seguida, para confirmar a correta inserção do cassete de recombinação, o transformante #1*fimH* foi selecionado e a região correspondente a recombinação homóloga foi analisada por sequenciamento de nucleotídeos utilizando os iniciadores

FimH-Fw e FimH-Rv. Após a comprovação da mutação, esse transformante foi selecionado como a cepa duplo mutante nos genes *afpA* e *fimH* e nomeado como UPEC-46::*afpA*::*fimH*.

Por fim, a **Figura 41** apresenta um esquema detalhado da recombinação homóloga do fragmento *fimH*:*clo* com o gene *fimH* da cepa UPEC-46::*afpA* para a obtenção da cepa duplo mutante (UPEC-46::*afpA*::*fimH*).

Figura 41 - Esquema da mutagênese pelo sistema λ Red usado na mutação do gene *fimH* da cepa UPEC-46::*afpA*



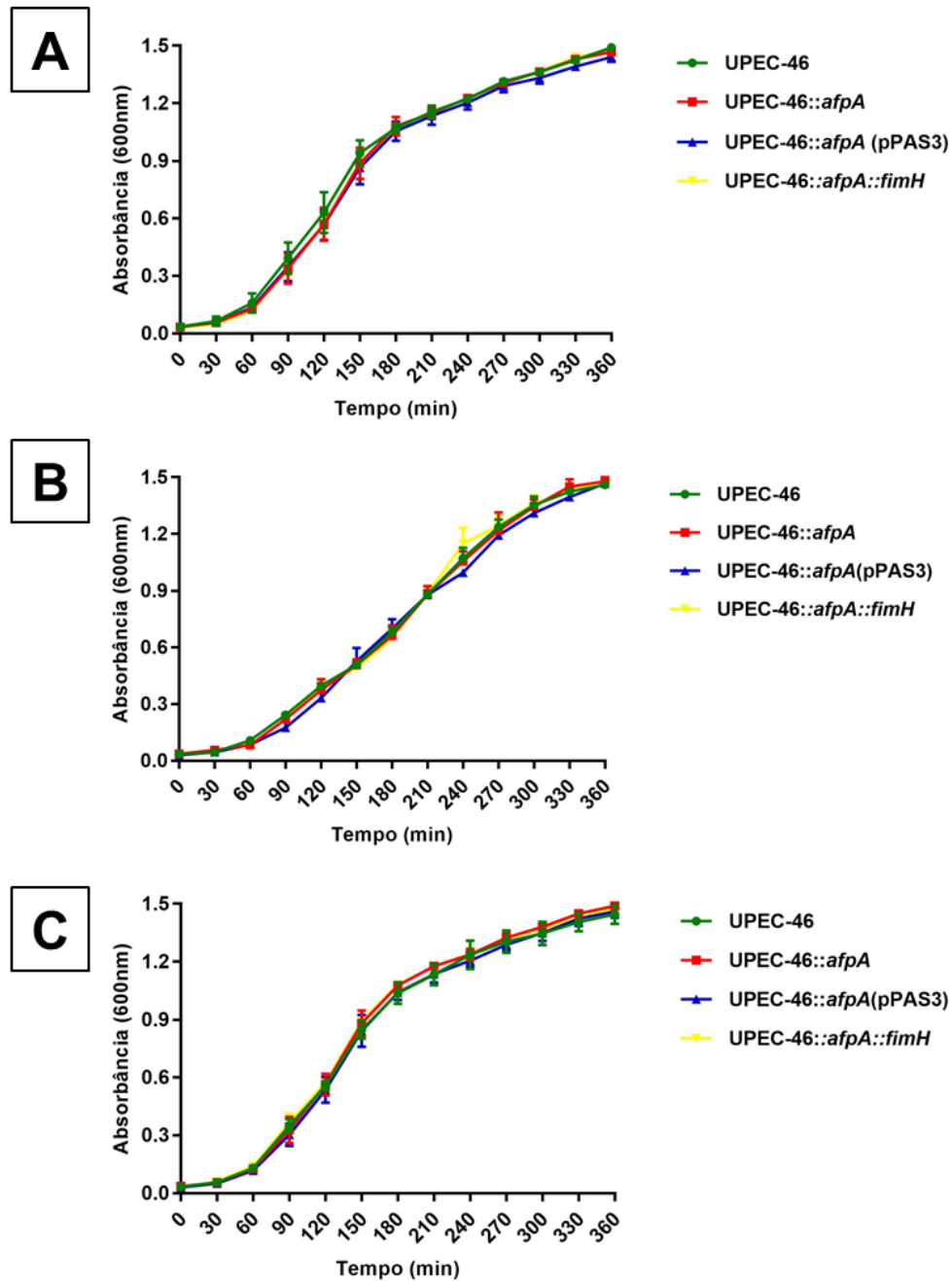
Esquema da inserção do fragmento *fimH*:*clo* no gene *fimH* na cepa UPEC-46::*afpA*. Nessa cepa, o gene *fimH* está representado em azul e as regiões *upstream* e *downstream* em vermelho. O gene *fimH* apresenta um tamanho de 903 pb, e os *codons* ATG e TAA correspondem ao *start* e *stop codon*, respectivamente. O fragmento *fimH*:*clo* foi obtido a partir do plasmídeo pKD3, utilizando os iniciadores FwRedFimH e RvRedFimH representados pelas setas verdes. Após a recombinação homóloga, houve a obtenção da cepa duplo mutante UPEC-46::*afpA*::*fimH* na qual estão representados o cassete de resistência a cloranfenicol (laranja), juntamente com pequenas partes dos genes *fimH* (azul), utilizadas para a recombinação. O novo fragmento inserido na cepa UPEC-46::*afpA*::*fimH* corresponde a 1175 pb.

4.7.2 Caracterização fenotípica das diferentes construções

Após a obtenção da cepa mutante em *afpA* (UPEC-46::*afpA*), seu complementado (UPEC-46::*afpA* (pPAS3)) e a cepa duplo mutante em *afpA* e *fimH* (UPEC-46::*afpA*::*fimH*), essas foram caracterizadas fenotipicamente quanto às curvas de crescimento e teste de motilidade em meio LB (0,3% ágar), para verificar se as diferentes construções haviam alterado a motilidade e/ou crescimento bacteriano.

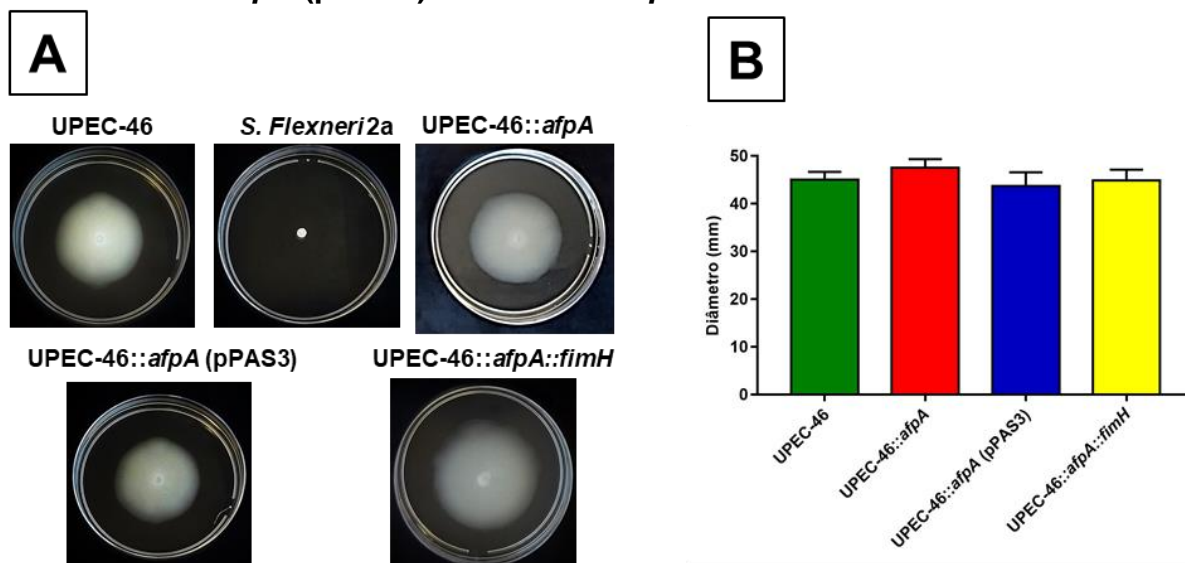
As curvas de crescimento nos meios LB, DMEM e RPMI confirmaram que as diferentes construções não alteraram significativamente as taxas de crescimento bacteriano. Além disso, ao analisar a motilidade, foi possível observar que todas as construções mantiveram o fenótipo de motilidade quando comparadas à cepa selvagem (UPEC-46). Os resultados obtidos e descritos acima estão apresentados nas **Figuras 42 e 43**.

Figura 42 - Curvas de crescimento das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA*::*fimH* em diferentes meios de cultura



Os valores de DO_{600} foram registrados a cada 30 min durante o cultivo das cepas em diferentes meios de cultura a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 6 h. Os dados representam a média \pm desvio padrão das triplicatas biológicas. **(A)** cepas avaliadas no meio LB; **(B)** cepas avaliadas no meio DMEM; **(C)** cepas avaliadas no meio RPMI.

Figura 43 - Ensaio de motilidade das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA*::*fimH*



Ensaio de motilidade para a cepa UPEC-46 e diferentes construções derivadas. A cepa bacteriana *Shigella flexneri 2a* foi utilizada como controle negativo de motilidade. **(A)** Motilidade das cepas em meio LB (0,3% ágar); **(B)** medida do diâmetro do halo de motilidade em milímetros. Os dados representam a média \pm desvio padrão das duplicatas técnicas e triplicatas biológicas. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett foi usado para comparar os resultados das diferentes construções à cepa UPEC-46.

Por fim, a influência destas mutações na expressão da fímbria tipo 1 foi verificada através do ensaio de aglutinação na presença ou ausência de 2% D-manose. Com exceção da cepa UPEC::*afpA*::*fimH* (mutante na fímbria tipo 1), todos as demais foram capazes de aglutinar na ausência de D-manose (**Tabela 12**), demonstrando que a mutação no gene *afpA* não afetou a expressão dessa fímbria.

Tabela 12 – Capacidade de aglutinação da cepa UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA*::*fimH*

Cepas	Aglutinação em <i>S. cerevisiae</i>	
	Ausência de D-manose	Presença de 2% D-manose
UPEC-46	+	-
UPEC-46:: <i>afpA</i>	+	-
UPEC-46:: <i>afpA</i> (pPAS3)	+	-
UPEC-46:: <i>afpA</i> :: <i>fimH</i>	-	-

A capacidade de aglutinação em *S. cerevisiae* foi avaliada como positiva (+) ou negativa (-).

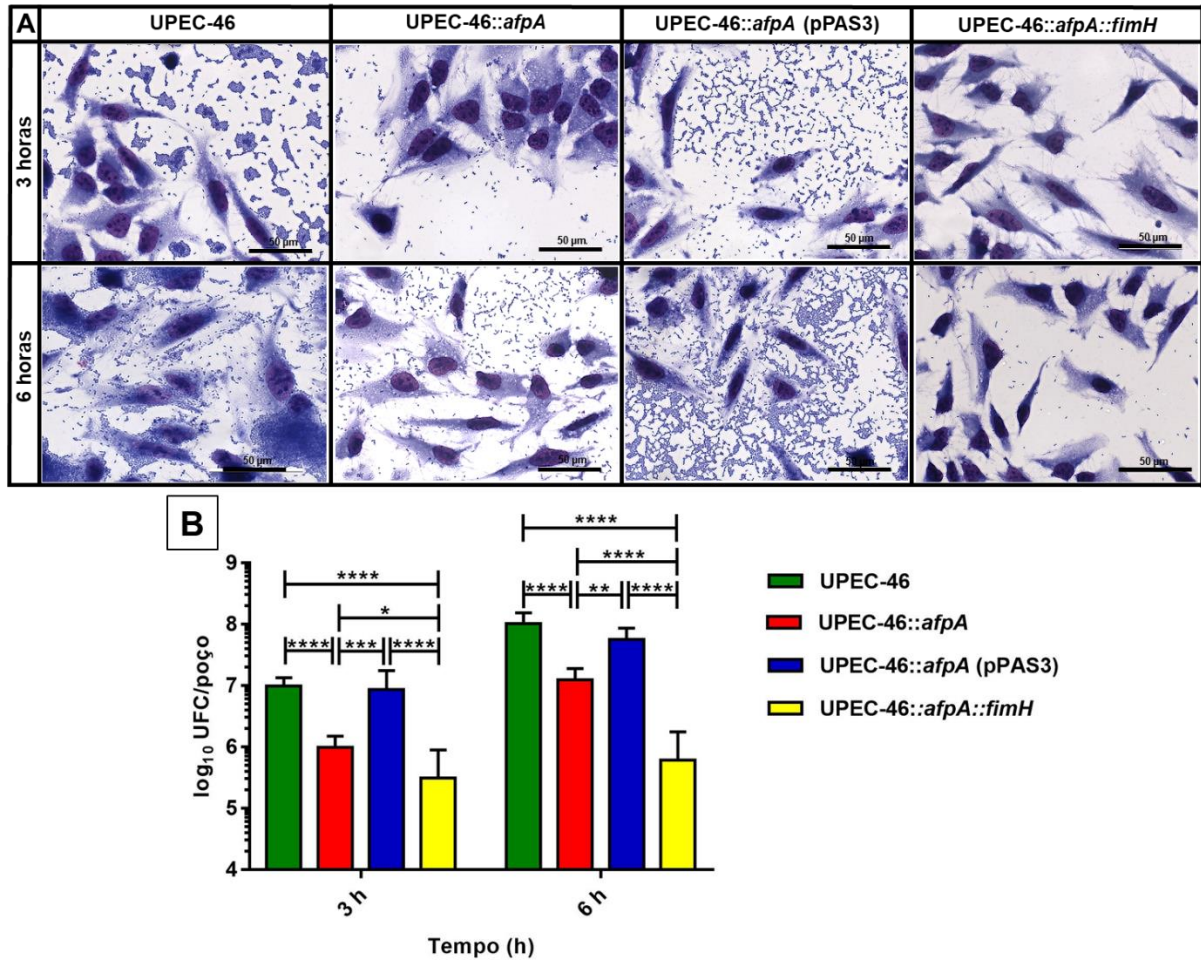
4.7.3 Análises de interação com diferentes linhagens de células epiteliais

Após a obtenção das diferentes construções para as adesinas envolvidas no estabelecimento do padrão AA da cepa UPEC-46, as mesmas foram analisadas em ensaios qualitativos e quantitativos de adesão utilizando as linhagens celulares HeLa, HT-29 e 5637, na ausência de D-manose e nos períodos de infecção de 3 ou 6 h.

Conforme mostrado nas **Figura 44A, 45A e 46A**, no ensaio qualitativo de adesão, a quantidade de bactérias aderidas foi visualmente superior nas cepas selvagem (UPEC-46) e complementada (UPEC-46::*afpA* (pPAS3)), quando comparadas com as cepas mutante em *afpA* (UPEC-46::*afpA*) e duplo mutante (UPEC-46::*afpA*::*fimH*).

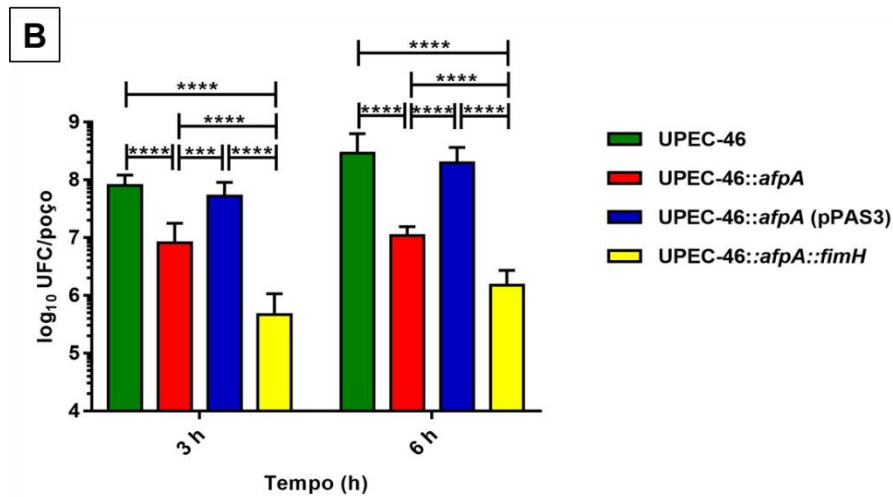
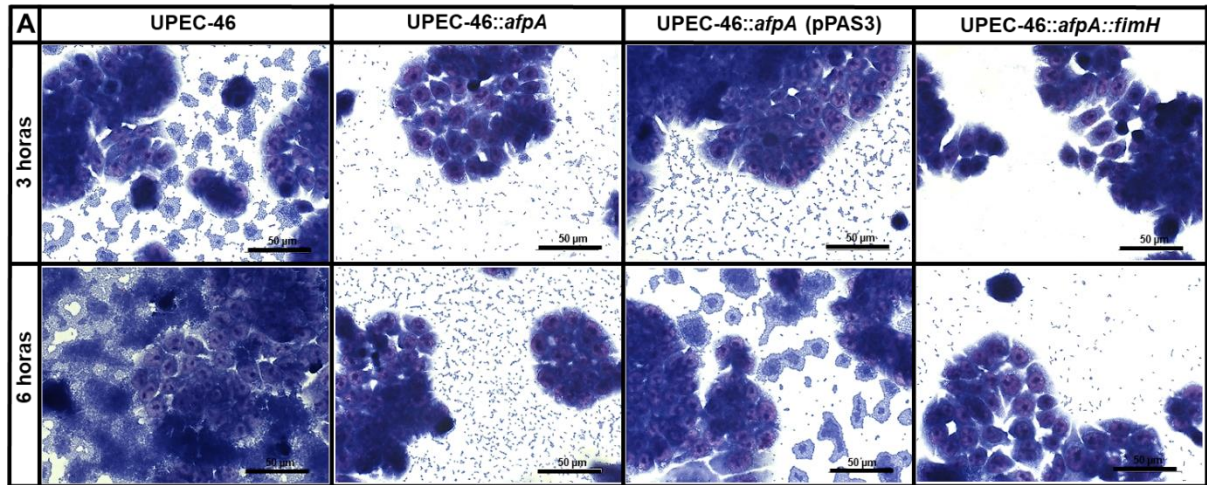
No ensaio quantitativo de adesão (**Figura 44B, 45B e 46B**), pode-se observar que a cepa UPEC-46 apresentou maior aderência em todas as linhagens celulares (HeLa, HT-29 e 5637) e períodos de infecção (3 e 6 h) analisados quando comparada com as cepas UPEC-46::*afpA* e UPEC-46::*afpA*::*fimH* ($P < 0,0001$). Além disso, a cepa complementada UPEC-46::*afpA* (pPAS3) restabeleceu a adesão em todas as condições testadas, com quantidade bacteriana significativamente semelhante quando comparado à cepa UPEC-46. Interessantemente, a cepa UPEC-46::*afpA*::*fimH* apresentou uma redução estatisticamente significativa na adesão quanto comparada com a cepa UPEC-46::*afpA* em todas as linhagens celulares ($P < 0,05$). Esse resultado demonstra o efeito sinérgico das adesinas AFP e fímbria tipo 1 no estabelecimento da aderência na cepa UPEC-46.

Figura 44 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA*::*fimH* em células HeLa



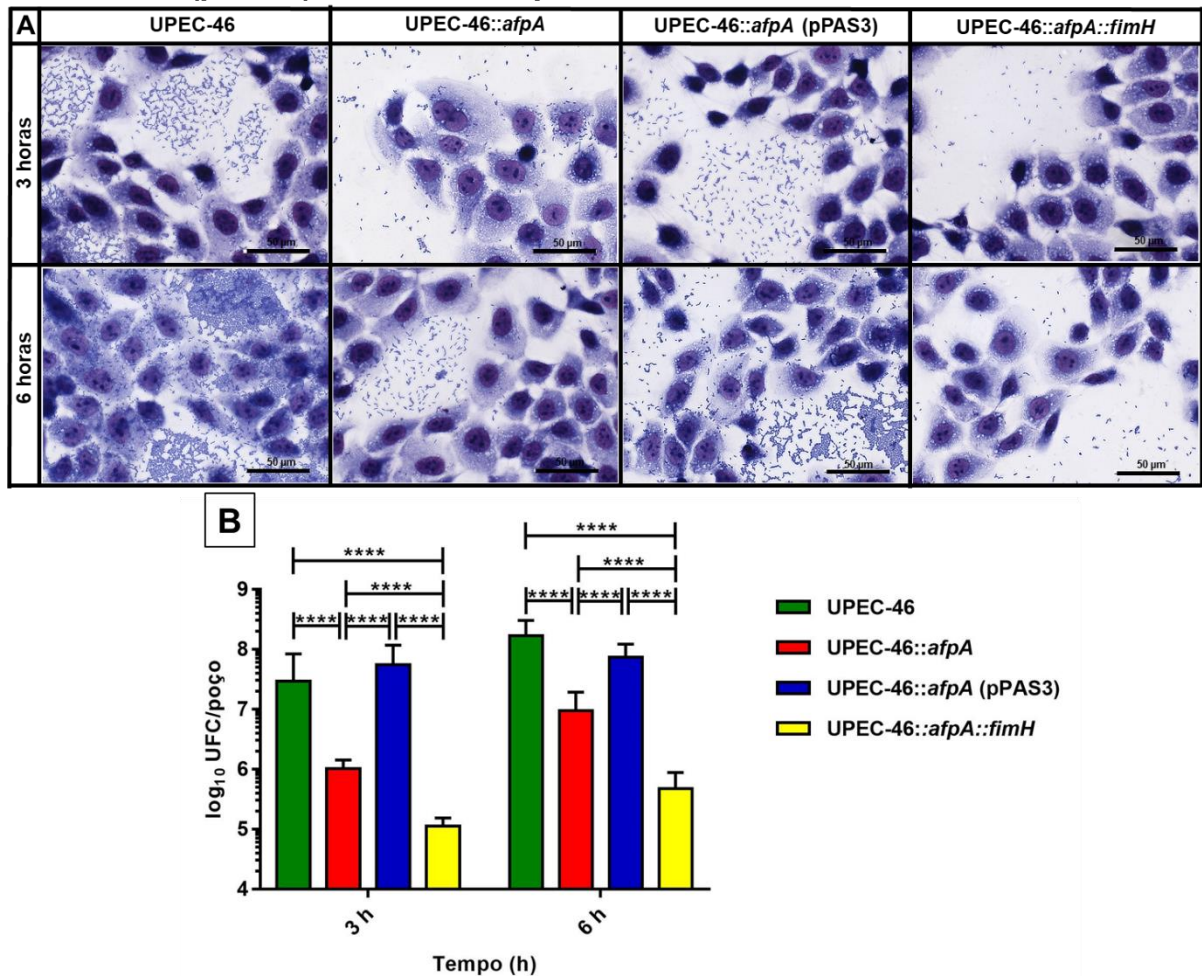
(A) Para os ensaios de adesão qualitativas, às células HeLa foram infectadas por períodos de 3 ou 6 h, na ausência de D-manose. Após o período de infecção, as células foram fixadas, coradas com as soluções corante May-Grünwald/Giemsa e observadas em microscópio óptico comum. Barras= 50 µm. **(B)** Para os ensaios de adesão quantitativas, às células HeLa foram infectadas (MOI = 100) por períodos de 3 ou 6 h, na ausência de D-manose. Após o período de infecção e lise com Triton-X-100 diluído a 1% em PBS 1X, a quantificação da adesão ocorreu em placas de ágar MC. Os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica e os dados apresentados consistem na média ± desvio padrão, sendo expressos em log₁₀ UFC/poço. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os resultados obtidos nesse experimento (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

Figura 45 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA*::*fimH* em células HT-29



(A) Para os ensaios de adesão qualitativa, às células HT-29 foram infectadas por períodos de 3 ou 6 h, na ausência de D-manose. Após o período de infecção, as células foram fixadas, coradas com as soluções corante May-Grünwald/Giemsa e observadas em microscópio ótico comum. Barras= 50 µm. **(B)** Para os ensaios de adesão quantitativa, às células HT-29 foram infectadas (MOI = 100) por períodos de 3 ou 6 h, na ausência de D-manose. Após o período de infecção e lise com Triton-X-100 diluído a 1% em PBS 1X, a quantificação da adesão ocorreu em placas de ágar MC. Os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica e os dados apresentados consistem na média ± desvio padrão, sendo expressos em \log_{10} UFC/poço. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os resultados obtidos nesse experimento (***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

Figura 46 - Aderência das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA*::*fimH* em células 5637

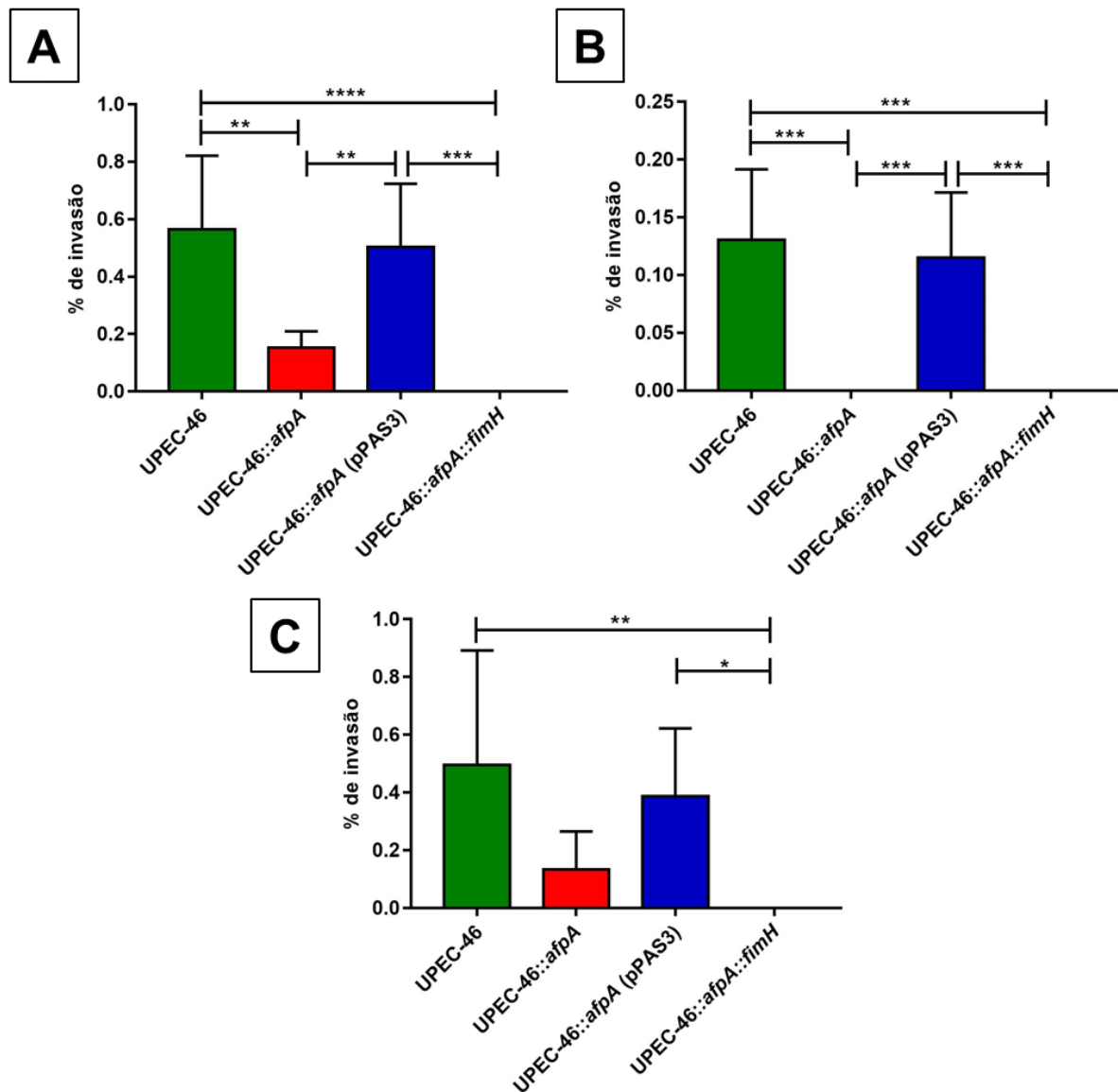


(A) Para os ensaios de adesão qualitativa, às células 5637 foram infectadas por períodos de 3 ou 6 h, na ausência de D-manose. Após o período de infecção, as células foram fixadas, coradas com as soluções corante May-Grünwald/Giemsa e observadas em microscópio óptico comum. Barras= 50 μ m. **(B)** Para os ensaios de adesão quantitativa, às células HT-29 foram infectadas (MOI = 100) por períodos de 3 ou 6 h, na ausência de D-manose. Após o período de infecção e lise com Triton-X-100 diluído a 1% em PBS 1X, a quantificação da adesão ocorreu em placas de ágar MC. Os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica e os dados apresentados consistem na média \pm desvio padrão, sendo expressos em log₁₀ UFC/poço. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os resultados obtidos nesse experimento (****, $P < 0,0001$).

A capacidade invasiva da cepa UPEC-46 foi comparada com as diferentes construções, empregando ensaios de 3 h na ausência de D-manose (**Figura 47**). Embora os índices de invasão observados para a cepa selvagem (UPEC-46) tenham sido baixos, esses se tornam significativamente inferiores na cepa UPEC-46::*afpA*, quando avaliada nas linhagens celulares de HeLa e HT-29 ($P < 0,01$). Para as células de bexiga (5637), foi observada uma diferença significativa apenas para a cepa

UPEC-46::*afpA*::*fimH* ($P < 0,01$). Ao contrário do teste quantitativo de adesão, não foram observadas diferenças significativas entre as cepas mutantes UPEC-46::*afpA* e UPEC-46::*afpA*::*fimH*. Além disso, a cepa complementada (UPEC-46::*afpA* (pPAS3)) restabeleceu o percentual de invasão em todas as condições testadas, com índices de invasão significativamente semelhante à cepa UPEC-46.

Figura 47 - Capacidade de invasão das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA*::*fimH* em diferentes linhagens celulares



Os ensaios quantitativos de invasão foram realizados em períodos de infecção de 3 h, utilizando as linhagens de células eucarióticas **(A)** HeLa, **(B)** HT-29 e **(C)** 5637, na ausência de D-manose. As células foram inicialmente infectadas com uma MOI de 100 por um período de 3 h e tratadas com gentamicina por 1 h para a eliminação de bactérias extracelulares. Posteriormente, as células foram lisadas com Triton-X-100 diluído a 1% em PBS 1X e a quantificação do número de bactérias internalizadas ocorreu em placas de ágar MC. O índice de invasão foi obtido analisando o número total de bactérias associadas, obtido por meio do ensaio quantitativo de adesão, e o número de bactérias internalizadas, obtidas após o

tratamento com gentamicina, utilizando o seguinte cálculo: número de bactérias internalizadas x 100 / número total de bactérias associadas. Os ensaios foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica. Os dados apresentados consistem na média \pm desvio padrão. O teste estatístico de análise de variância (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os resultados obtidos nesse experimento (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

4.7.4 Modelo animal de colonização intestinal

A partir dos dados obtidos *in vitro* com as células HeLa, HT-29 (intestinal) e 5637 (urinária), comparando a cepa UPEC-46 aos mutantes construídos nas adesinas AFP e fímbria tipo 1, ficou evidenciado a grande importância dessas adesinas nos processos de adesão e invasão da UPEC-46. Considerando que o *pilus* AFP foi descrito originalmente em uma cepa EAEC/STEC isolada de fezes (LANG et al., 2018), que cepas de UPEC podem colonizar os intestinos como comensais (SARKAR et al., 2018; SPAULDING et al., 2017; VIMONT et al., 2012) e que a cepa UPEC-46 é capaz de aderir às células intestinais HT-29 (dados do presente estudo), surgiu a hipótese de que a cepa UPEC-46 pudesse colonizar a mucosa intestinal e que AFP tivesse papel nesse fenótipo.

Para avaliar o papel dessas adesinas *in vivo*, foi utilizado o modelo de colonização intestinal de camundongos tratados com estreptomicina, onde tais animais foram oralmente infectados com uma carga bacteriana de $1,0 \times 10^3$ UFC, seguida da enumeração bacteriana diária nas fezes por 14 dias. Nesse ensaio, foram avaliadas as cepas UPEC-46, mutante em *afpA* (UPEC-46::*afpA*) e seu complementado (UPEC-46::*afpA* (pPAS3)), além da cepa duplo mutante em *afpA* e *fimH* (UPEC-46::*afpA*::*fimH*).

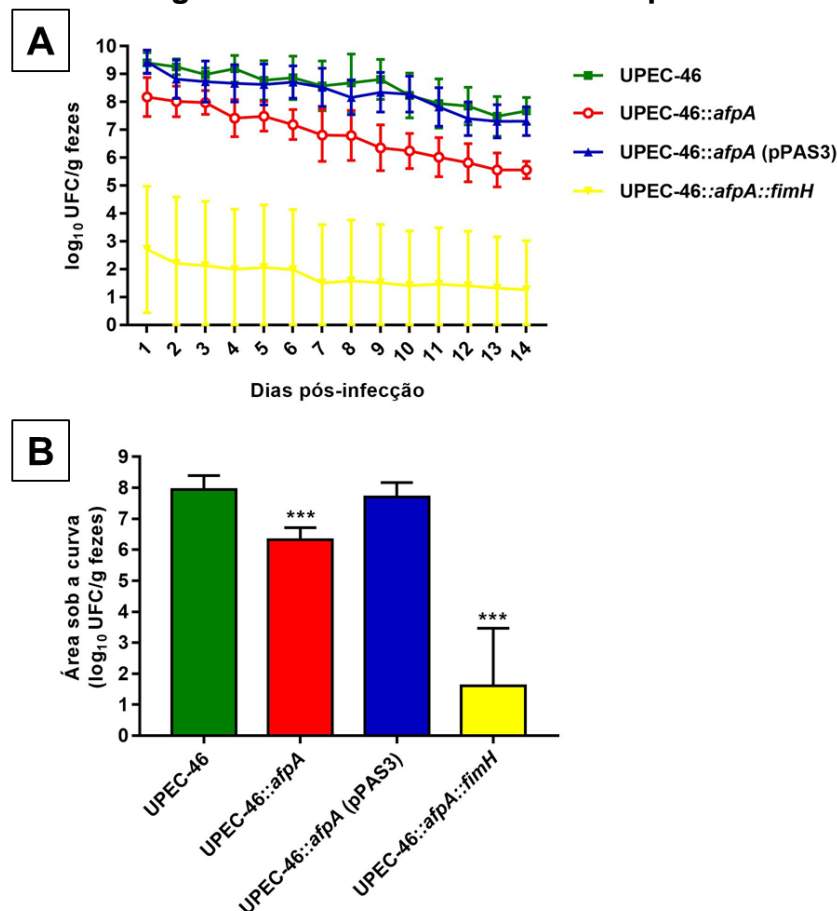
Os camundongos foram colonizados tanto pela cepa selvagem quanto pelas diferentes construções durante os 14 dias de infecção, sem apresentar sinais clínicos de doença. Em paralelo, pode-se observar que em todas as cepas avaliadas a carga bacteriana decresce ao longo dos dias de infecção, sendo maior nos primeiros e menor nos últimos dias avaliados (**Figura 48A**). Além disso, todas as cepas foram confirmadas por PCR para amplificação do gene *afpB* (componente do locus *afp*), por meio dos iniciadores 4534-Fw e 4534-Rv, a partir das fezes dos animais durante todo experimento (dados não mostrados).

Concomitantemente, quando os níveis de colonização foram comparados ao longo dos 14 dias, pode-se observar que a carga bacteriana cumulativa para a cepa

selvagem foi significativamente superior quando comparada com as cepas mutantes (UPEC-46::*afpA* e UPEC-46::*afpA::fimH*) ($P < 0,001$). Além do mais, ao avaliar a carga bacteriana média, expressa em \log_{10} UFC/g de fezes nas cepas mutantes, verificou-se que a cepa UPEC-46::*afpA::fimH* apresentou uma carga bacteriana média menor quando comparada com a cepa UPEC-46::*afpA*. Por fim, a cepa complementada em *afpA* restabeleceu os níveis de colonização intestinal, apresentado uma carga bacteriana cumulativa significativamente semelhante quando comparado à cepa UPEC-46. Tais resultados descritos estão apresentados na **Figura 48B**.

Os dados obtidos indicam que as adesinas AFP e fímbria tipo 1 desempenham um importante papel na colonização intestinal, uma vez que a ausência de ambas adesinas diminui de forma significativa a eficiência da colonização intestinal.

Figura 48 - Capacidade de colonização intestinal das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA::fimH* em camundongos BALB/c tratados com estreptomicina



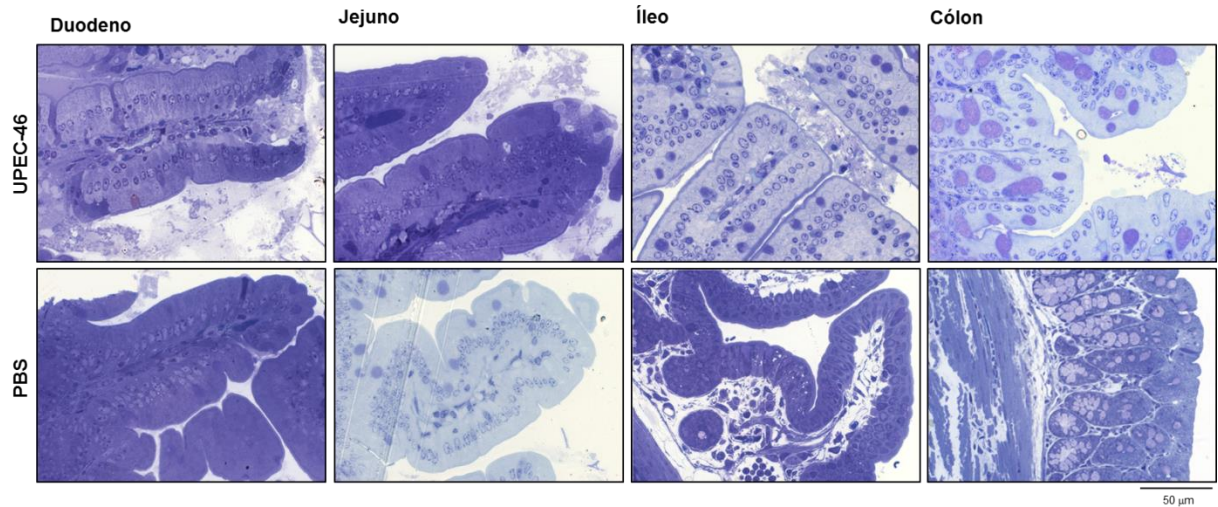
(A) Grupos de oito camundongos fêmea BALB/c foram infectados por gavagem com $1,0 \times 10^3$ UFC da cepa selvagem UPEC-46, mutante e mutante complementada na adesinas AFP e o

mutante na fímbria tipo 1. Durante os 14 dias de experimento, as fezes desses animais foram coletadas, homogeneizadas e plaqueadas em ágar MC suplementados com os antibióticos apropriados para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os dados expressos no gráfico consistem na média \pm desvio padrão, sendo estes expressos em \log_{10} UFC/grama de fezes. **(B)** Carga bacteriana cumulativa (área sob a curva no gráfico em **A**) nas fezes dos camundongos após os 14 dias de infecção. Os dados expressos nesse gráfico consistem na média \pm desvio padrão, sendo esses expressos em \log_{10} UFC/grama de fezes. A análise estatística foi realizada usando o teste de Mann-Whitney comparando-se à cepa selvagem (UPEC-46) com as outras cepas (***, $P < 0,001$).

Além das contagens bacterianas, analisamos os tecidos dos animais infectados para cada cepa avaliada. Inicialmente analisamos fragmentos de diferentes porções do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) após gavagem com a cepa selvagem (UPEC-46), para verificar em qual porção do intestino haveria maior colonização. As diferentes regiões intestinais foram analisadas por microscopia de luz utilizando os cortes sem-finos para uma triagem rápida da presença de bactérias aderidas.

Nos fragmentos de duodeno, jejuno e íleo foi observada a presença abundante de debris celulares, restos de alimentos e produtos de secreção intestinal, assim como bactérias misturadas a esse conjunto. Bactérias aderidas ao epitélio não foram observadas no duodeno e jejuno. Na porção intestinal do íleo foram observadas bactérias esporadicamente aderidas no epitélio. No cólon, a quantidade de detritos observados foi consideravelmente menor, e bactérias aderidas foram observadas com uma frequência maior (**Figura 49**).

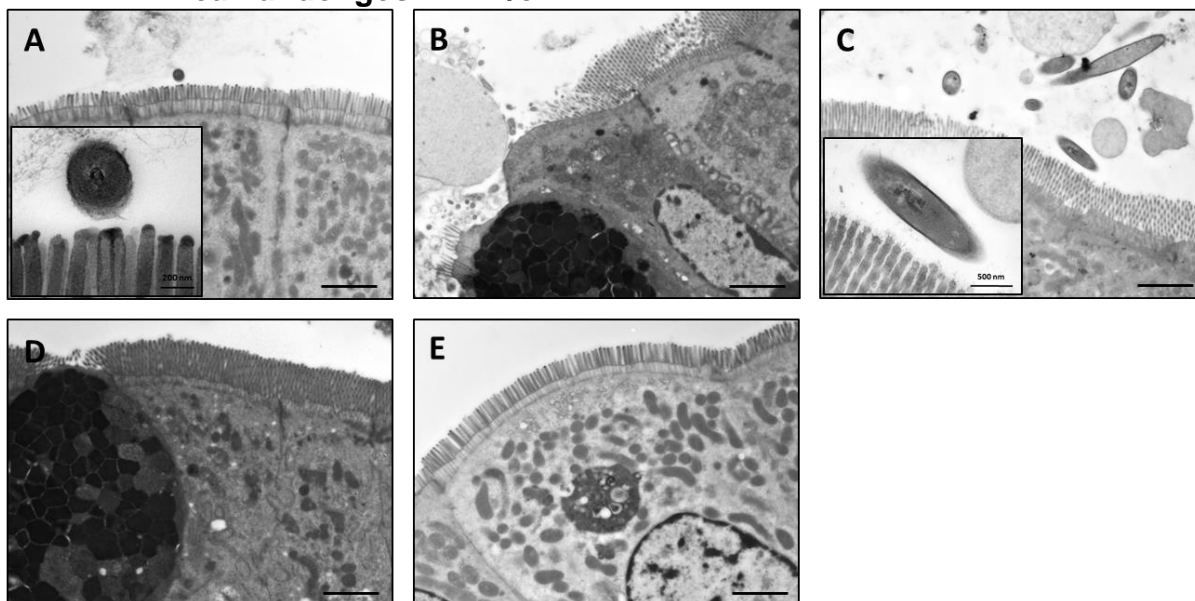
Figura 49 - Avaliação da colonização intestinal em diferentes poções do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) após inoculação da UPEC-46 em camundongos BALB/c



A avaliação da colonização intestinal (duodeno, jejuno, íleo e cólon) foi realizada em camundongos BALB/c tratados com estreptomicina. Foram testados animais infectados com a cepa selvagem UPEC-46 ($1,0 \times 10^3$ UFC) e animais inoculados com PBS 1X foram utilizados como controle. Análise realizada por microscopia de luz (cortes semi-finos de blocos preparados para MET corados com azul de toluidina). Barra = 50 μ m.

Após essa triagem inicial, a região intestinal do cólon (região mais colonizada pela cepa UPEC-46) foi analisada por MET nas inoculações com as diferentes construções. Não foram observadas bactérias aderidas ao epitélio nos fragmentos de cólon dos animais inoculados com as cepas mutante em *afpA* e duplo mutante em *afp* e *fimH*. Nos fragmentos de cólon dos animais inoculados com as cepas selvagem e complementada em *afpA* foram observadas bactérias aderidas (**Figura 50**). Entretanto, assim como observado para a microscopia de luz, a quantidade de bactérias aderidas foi considerada baixa.

Figura 50 - Capacidade das cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA*::*fimH* de colonizar o cólon de camundongos BALB/c



A avaliação da colonização intestinal do cólon foi realizada em camundongos BALB/c tratados com estreptomicina e analisados por MET. Os animais foram infectados com $1,0 \times 10^3$ UFC das cepas (A) selvagem UPEC-45, (B) selvagem mutada em *afpA* (UPEC-46::*afpA*), (C) selvagem mutada em *afpA* complementada com pPAS3 (UPEC-46::*afpA* (pPAS3)) e (D) selvagem mutada em *afpA* e *fimH* (UPEC-46::*afpA*::*fimH*). (E) Controle negativo inoculado com PBS 1X. Barras = 2 μ m.

4.7.5 Modelo animal de ITU por meio da colonização de rins e bexiga

Considerando o fato da cepa UPEC-46 ter sido isolada de um paciente com ITU sintomática (ABE et al., 2008), além de evidenciar nas análises *in vitro* que mutantes construídos nas adesinas AFP e fímbria tipo 1 apresentaram alterações nos processos de adesão e invasão em células de bexiga (dados do presente estudo), o papel dessas adesinas na capacidade de colonização de órgãos do trato urinário foi avaliado *in vivo* no modelo murino de ITU ascendente.

Nesse modelo, grupos de oito camundongos fêmea C57BL/6 foram inoculados transuretralmente com $1,0 \times 10^9$ UFC e após 72 h bexigas e rins foram coletados para a quantificação bacteriana/grama de tecido. Nesse ensaio, também foram avaliadas as cepas UPEC-46, a cepa mutante em *afpA* (UPEC-46::*afpA*) e seu complementado (UPEC-46::*afpA* (pPAS3)), além da cepa duplo mutante em *afpA* e *fimH* (UPEC-46::*afpA*::*fimH*).

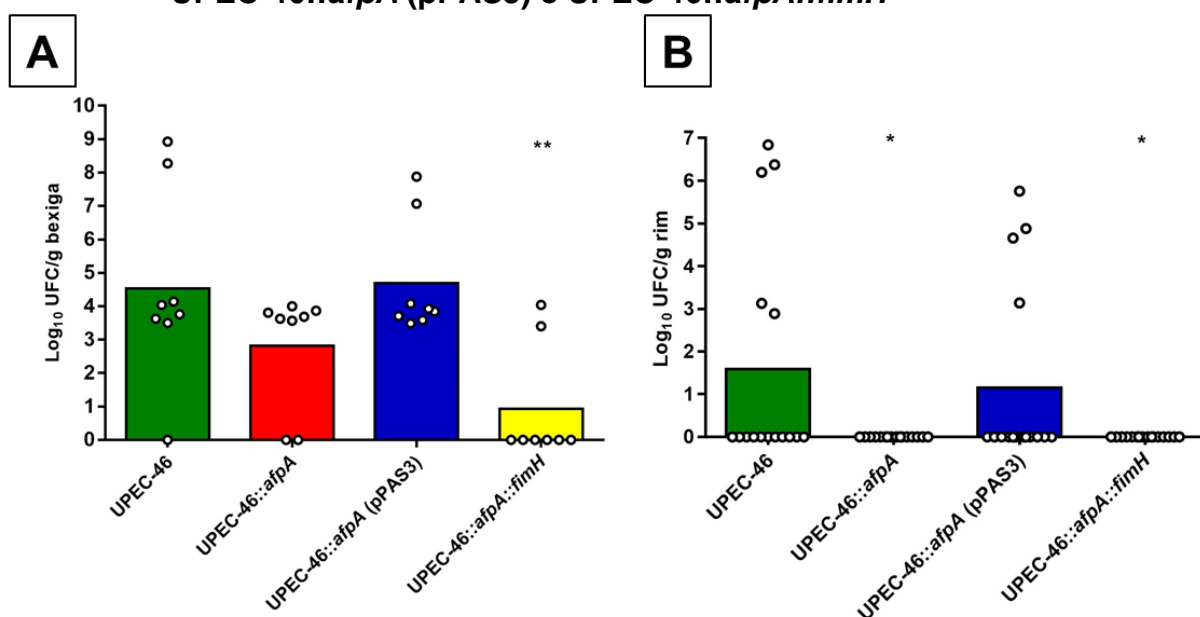
A cepa selvagem (UPEC-46) foi capaz de colonizar bexiga e rins, apresentando índices médios de infecção próximos a 10^5 UFC/g na bexiga e 10^2

UFC/g nos rins (**Figura 51**). Pode-se evidenciar que a mutação no gene *afpA* foi capaz de reduzir os índices médios de infecção na bexiga na cepa UPEC-46::*afpA*, mas apenas a dupla mutação expressa na cepa UPEC-46::*afpA*::*fimH* reduziu de forma significativa o índice de colonização nas bexigas avaliadas ($P<0,05$).

Com relação à colonização renal, observa-se que a cepa mutante no gene *afpA* não foi capaz de colonizar esse órgão, evidenciando um importante papel da adesina AFP na colonização desse órgão do trato urinário. Além disso, a cepa complementada em *afpA* restabeleceu os níveis de colonização nas bexigas e rins em quantidades significativamente semelhante quando comparado à cepa UPEC-46. Adicionalmente, a identidade da cepa UPEC-46 foi confirmada nas colônias isoladas de todos os órgãos colonizados por meio de PCR com os iniciadores 4534-Fw e 4534-Rv, usados para amplificação do gene *afpB* (dados não mostrados).

Os dados obtidos nesse modelo murino de ITU mostraram que as adesinas AFP e fímbria tipo 1 desempenham um importante papel na colonização de órgãos do trato urinário, atuando de forma sinérgica para uma ITU mais eficiente, uma vez que auxiliam na colonização tanto da bexiga quanto os rins.

Figura 51 - Colonização de órgãos do trato urinário de camundongos C57BL/6 após inoculação transuretral com as cepas UPEC-46, UPEC-46::*afpA*, UPEC-46::*afpA* (pPAS3) e UPEC-46::*afpA*::*fimH*

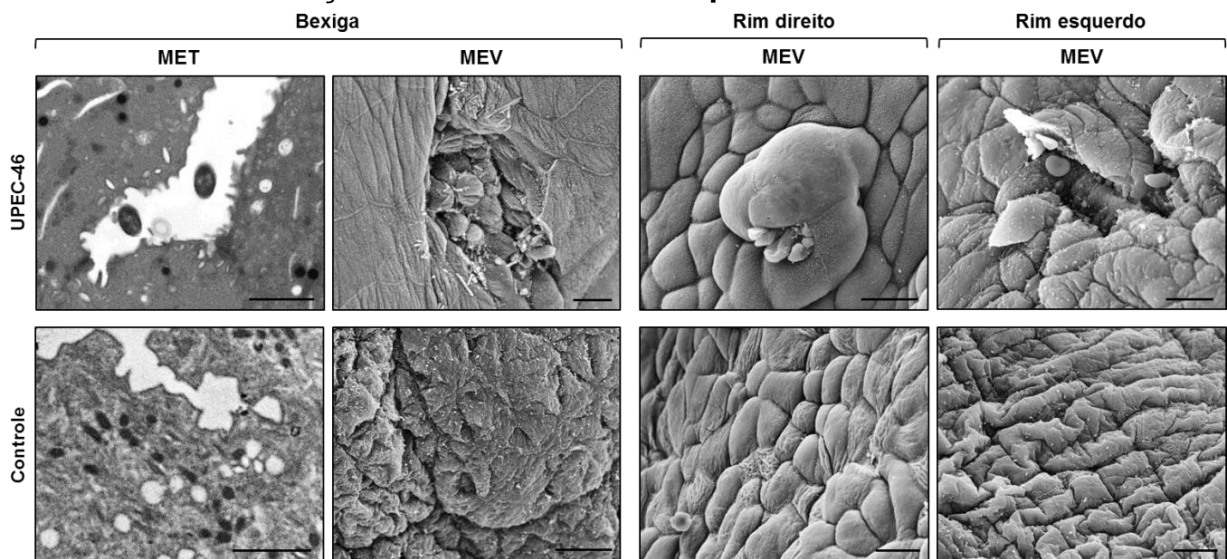


Grupos de oito camundongos fêmea C57BL/6 foram infectados por via uretral com $1,0 \times 10^9$ UFC da cepa selvagem UPEC-46, mutante e mutante complementado na adesinas AFP e o mutante na fímbria tipo 1 e AFP. Após 72 h da inoculação os animais foram eutanasiados e tiveram sua bexiga e rins coletados, homogeneizadas e plaqueadas em ágar MC suplementados com os antibióticos apropriados para a contagem de unidades formadoras de

colônias (UFC). Os pontos expressos no gráfico consistem nos valores de contagem para cada órgão coletado, sendo estes expressos em \log_{10} UFC/grama de órgão. **(A)** enumeração bacteriana na bexiga de cada animal, **(B)** enumeração bacteriana nos rins de cada animal. A análise estatística foi realizada usando o teste de Mann-Whitney comparando-se à cepa selvagem (UPEC-46) com as outras cepas (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).

Além das contagens bacterianas, bexigas e rins dos animais infectados com a cepa selvagem (UPEC-46) foram analisados por MET e MEV. Conforme apresentado na **Figura 52**, na infecção com a cepa UPEC-46 é possível observar bactérias aderidas ao epitélio lesionado da bexiga. Nos rins, o tecido epitelial parece ter sofrido pequenas alterações em alguns campos, no entanto, bactérias não foram observadas nessas áreas. Para o animal controle inoculado com PBS 1X não foram observadas bactérias ou alterações histológicas no epitélio da bexiga ou dos rins.

Figura 52 - Colonização da bexiga e rins de camundongos C57BL/6 após inoculação transuretral com a cepa UPEC-46



Após o ensaio de infecção ascendente do trato urinário em camundongos C57BL/6 com inóculo de $1,0 \times 10^9$ UFC da cepa selvagem UPEC-46, foram coletados fragmentos de bexiga e rins para análises por MET e MEV. Animais controle foram inoculados com PBS 1X. Barras: MET, 2 μm e MEV, 10 μm .

5 DISCUSSÃO

Cepas híbridas de EAEC/ExPEC vêm sendo associadas como importantes agentes bacterianos em nosso meio, sendo comumente isoladas de casos de diarreia ou infecções extraintestinais (ABE et al., 2008; FLAMENT-SIMON et al., 2020; FREIRE et al., 2020; LARA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2021; NAZEMI et al., 2011; NUNES et al., 2017; PARK et al., 2009; RIVEROS et al., 2017; TOVAL et al., 2014). Apesar dessa recente importância epidemiológica, alguns aspectos relacionados à patogênese dessas cepas ainda necessitam ser melhor investigados.

Neste estudo, inicialmente, investigamos as características genotípicas e fenotípicas da cepa UPEC-46, uma cepa de *E. coli* isolada de ITU com a capacidade de produzir o padrão AA em cultura de células e abrigando diferentes fatores de virulência associados a EAEC (ABE et al., 2008; FALSETTI, 1998; SALVADOR, 2006). Em nossas análises iniciais, demonstramos que a ausência de marcadores de virulência específicos de ExPEC e UPEC classificou essa cepa como ExPEC negativa (ExPEC-) e UPEC negativa (UPEC-), respectivamente (JOHNSON et al., 2003; SPURBECK et al., 2012). Embora a presença desses marcadores se correlacione com o potencial extraintestinal e uropatogênico de cepas de *E. coli*, algumas infecções extraintestinais têm sido causadas por cepas desprovidas desses genes (FLAMENT-SIMON et al., 2020; FREIRE et al., 2020; SANTOS et al., 2013).

Nesse sentido, não há um fator de virulência específico que realmente defina e detecte cepas de *E. coli* que causem ITU, no entanto, vários genes, incluindo alguns associados a adesinas, toxinas, fatores de aquisição de ferro, cápsulas de polissacarídeo, resistência sérica e invasinas têm sido epidemiologicamente mais associados a infecções extraintestinais (KÖHLER; DOBRINDT, 2011). Sendo assim, cepas capazes de colonizar o trato urinário e causar ITU pela combinação de diferentes fatores de virulência são frequentemente consideradas patógenos altamente versáteis (ABE et al., 2008; HERZOG et al., 2014; TOVAL et al., 2014). Conseqüentemente, uma compreensão avançada da interação de cepas de *E. coli* híbridas em nichos intestinais e extraintestinais é necessária para melhorar a tipagem dessas cepas a fim de detectar determinantes de virulência relacionados a tais infecções.

A capacidade das cepas bacterianas em aderir e invadir as células do hospedeiro são mecanismos importantes de virulência, os quais implicam diretamente

no aumento da patogenicidade, uma vez que esses processos são associados a infecções persistentes (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996; OWRANGI et al., 2018). As ITUs recorrentes estão relacionadas às características de invasão, persistência e multiplicação dentro do epitélio urinário. Além disso, a capacidade de invadir as células hospedeiras permite que as bactérias evadam ao sistema imunológico e resistam a certos antibióticos (LEWIS; RICHARDS; MULVEY, 2016). Inicialmente, demonstramos de forma qualitativa e quantitativa que a cepa UPEC-46 apresenta capacidade de aderir *in vitro* nas três diferentes linhagens celulares epiteliais testadas, incluindo as de origem de bexiga (5637) e de intestino (HT-29). Os achados do presente estudo evidenciaram a capacidade da cepa UPEC-46 de invadir linhagens celulares derivadas dos tratos urinário e intestinal, embora essas taxas de internalização tenham sido consideravelmente menores do que as da cepa usada como controle de invasão (*S. flexneri* 2a). Portanto, esses resultados iniciais demonstraram a capacidade dessa cepa em aderir e invadir a diferentes células epiteliais, sugerindo assim que a UPEC-46 poderia estar associada à ITU, ou mesmo à diarreia. Nesse aspecto, em um estudo conduzido por Valiatti et al. (2020) ao avaliarem uma cepa híbrida EPEC/UPEC (UPEC 252), verificou-se que essa cepa foi capaz de colonizar linhagens celulares do trato urinário (T24 e HEK292-T), além de linhagens celulares intestinais (Caco-2 e LS174T), demonstrando que tal cepa poderia potencialmente causar infecções intestinais e extraintestinais.

A formação de biofilme é considerada uma etapa importante durante a patogenicidade das cepas de UPEC e EAEC (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996; FLORES-MIRELES et al., 2015), permitindo que a bactéria persista no hospedeiro estando assim associada à gravidade da infecção (HØIBY et al., 2011). A cepa UPEC-46 foi capaz de aderir a diferentes linhagens de células epiteliais e expressou importantes fatores de virulência associados à formação de biofilme, como a fímbria tipo 1, curli e celulose, mas não foi capaz de produzir um biofilme intenso usando diferentes superfícies abióticas e meios de cultura. Alguns estudos mostraram que fatores de virulência específicos de EAEC, como *aggR* e as adesinas AAFs, permitem a formação de biofilme em níveis significativamente mais elevados do que cepas negativas ou defectivas a esses fatores (BOLL et al., 2013; SHEIKH et al., 2001), o que poderia corroborar com os resultados obtidos neste estudo. Além do mais, a formação de biofilme se mostrou mais presente na ausência de α -D-man, sugerindo que a fímbria tipo 1 estaria envolvida na fraca produção de

biofilme presente na UPEC-46. Esse dado é concordante com diversos estudos na qual demonstram o papel dessa adesina na formação de biofilme em cepas de UPEC e em cepas EAEC (MELICAN et al., 2011; MOREIRA et al., 2003; SHEIKH et al., 2001; STÆRK et al., 2016; ZAMANI; SALEHZADEH, 2018).

Para entendermos melhor a cinética da formação de biofilme na cepa UPEC-46, foram realizados ensaios em diferentes tempos de infecção (3, 6, 9, 12 e 24 h). Foi observado que na ausência do α -D-man ocorre um aumento progressivo nos valores de DO até atingir seu valor máximo no período de 9 h, decaindo a partir deste momento. Nossos dados enfatizam que a formação de biofilme neste ensaio poderia se dar devido à ação da fímbria do tipo 1, a qual é importante nas primeiras horas de infecção. Entretanto, mais estudos avaliando a cinética da expressão dessa fímbria devem ser realizados para comprovar essa hipótese. Cabe salientar que após o período de 9 h é observado que este biofilme não consegue se manter, ou seja, não amadurece, diminuindo assim a sua intensidade. A formação de biofilme é dependente de múltiplos fatores da bactéria sob regulação de expressão por diferentes sinais, tais como osmolaridade, pH e composição do meio de cultivo (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; SHEIKH et al., 2001; SUTRINA et al., 2015). Dessa forma, alguns estudos analisam a formação de biofilme em UPEC cultivando as cepas em meio de cultura que mimetiza a urina humana ou mesmo em *pool* de urina humana de voluntários (STORK et al., 2018; TOVAL et al., 2014). Dados obtidos em outro estudo com a cepa UPEC-46 mostraram a sua incapacidade de formar biofilme mesmo quando cultivada em *pool* de urina humana (Dr. Waldir P. Elias, Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan – dados não publicados).

A secreção de moléculas inibidoras (bacteriocinas) aumentam a competitividade de cepas de *E. coli* (STORK et al., 2018). A produção de bacteriocinas tem sido frequentemente relatada em isolados fecais e extraintestinais (MICENKOVÁ et al., 2014). Além disso, esses fatores bacterianos produzidos foram relacionados à colonização de cateteres, interferindo no crescimento de cepas bacterianas sensíveis a tais bacteriocinas (TRAUTNER; HULL; DAROUICHE, 2005). A colicina E1, detectada na cepa UPEC-46, foi associada como um fator de virulência potencialmente importante em cepas de *E. coli* (SMAJS et al., 2010). Assim, sua produção poderia auxiliar na capacidade patogênica da UPEC-46, permitindo que essa cepa seja uma colonizadora competitiva no trato urinário e intestinal contra outras cepas de *E. coli* comensais ou patogênicas presentes no microbioma.

As ITUs podem levar à infecção da corrente sanguínea e os fatores que permitem que essas cepas resistam à atividade bactericida do soro humano são mecanismos de virulência importantes para o desenvolvimento da urosepse (COGGON et al., 2018). A análise do genoma da UPEC-46 revelou a presença do gene *iss* e de genes responsáveis pela síntese da cápsula do grupo 4, as quais conferem às cepas de *E. coli* resistência ao poder bactericida do soro (BINNS; DAVIES; HARDY, 1979; BIRAN; ROSENSHINE; RON, 2020). Além do mais, a capacidade de resistência a componentes do soro humano normal também foi confirmada para UPEC-46 em experimentos realizados *in vitro*. O sistema complemento é a primeira barreira imunológica para controlar os patógenos que chegam à corrente sanguínea. A resistência a tais componentes confere ao patógeno a possibilidade de se espalhar para diferentes locais do corpo, aumentando a gravidade da sepse, e levando a diferentes tipos de infecções extraintestinais (ABREU; BARBOSA, 2017; DESROCHES et al., 2018; HUGHES; PHILLIPS; ROBERTS, 1982). Portanto, a capacidade de resistir à ação bactericida de componentes do soro é fundamental para a patogenicidade das cepas que chegam à corrente sanguínea, pois permite que as bactérias se espalhem e colonizem diferentes sítios anatômicos, agravando o quadro clínico do paciente. Considerando que a cepa UPEC-46 foi isolada de um quadro de ITU, a presença dos fatores de virulência relacionados à evasão ao sistema imune indica o potencial dessa cepa de sobreviver na corrente circulatória no caso da ITU progredir para o quadro de urosepse. Entretanto, não dispomos dos dados clínicos do paciente do qual a UPEC-46 foi isolada para analisar a progressão do quadro de ITU.

A capacidade hemolítica é um importante fator de virulência comumente associado à lise de eritrócitos e células epiteliais, levando à captura de íons de ferro, escape ao sistema fagocítico e a casos mais graves de sepse (JOHNSEN et al., 2019; WALLACE et al., 2000). Nesse estudo, demonstramos que embora positiva ao gene da hemolisina *hlyE*, a cepa UPEC-46 foi incapaz de hemolisar hemácias de carneiro em períodos de incubação de 3 e 24 h. A hemolisina HlyE tem sido considerada uma “hemolisina silenciosa” pois, embora ocorra ampla distribuição do gene *hlyE* entre as cepas de *E. coli*, sua expressão é reprimida pela proteína estruturante de nucleóide semelhante à histona (LUDWIG et al., 1999; WESTERMARK et al., 2000; WYBORN et al., 2004). Outro fator a ser considerado é a concentração de oxigênio presente no cultivo bacteriano. Murase et al. (2012) indicaram que o nível de transcrição do gene

hlyE é significativamente regulado positivamente sob condições anaeróbicas. Além disso, foi demonstrado que essa toxina é produzida no intestino anaeróbio de mamíferos infectados com cepas HlyE positivas, podendo contribuir para a colonização do hospedeiro (WALLACE et al., 2000). Sendo assim, a ausência de hemólise observada no ensaio fenotípico não descarta a possível importância de HlyE na patogênese da cepa UPEC-46.

As proteínas autotransportadoras são representantes do sistema de secreção do tipo 5 (SST5) e frequentemente têm sido associadas à patogênese em cepas de *E. coli*, sendo consideradas importantes fatores de virulência presentes em diversos patotipos (ZUDE; LEIMBACH; DOBRINDT, 2014). Uma proteína autotransportadora importante e bem caracterizado é Pet, cujo gene foi encontrado no genoma da cepa UPEC-46 e sua expressão detectada por *immunoblotting*. Essa serinoprotease tem sido associada ao efeito citotóxico em células de cultura epitelial causando um rearranjo citoesquelético e contração celular na infecção por EAEC (NAVARRO-GARCÍA, 2010; NAVARRO-GARCÍA; ELIAS, 2011). Em termos epidemiológicos, o gene *pet* é um importante fator de virulência prevalente em cepas de EAEC (ANDRADE et al., 2017), mas também detectado em outros patotipos de DEC (ABREU et al., 2013). Recentemente, Freire et al. (2020) mostraram a presença de uma cepa de *E. coli* (EC092), positiva ao gene *pet*, isolada de um caso de bacteremia no Brasil. Além disso, nosso grupo também verificou que a proteína Pet purificada tem efeito citotóxico em células epiteliais de bexiga humana (linhagem 5637) (Dra. Rita de Cássia Ruiz, Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan - dados não publicados). Nesse sentido, acreditamos que na UPEC-46 a proteína Pet poderia estar relacionada aos mecanismos envolvidos na uropatogênese dessa cepa, além de atuar na sua função intrínseca descrita durante a colonização intestinal (NAVARRO-GARCÍA, 2010; NAVARRO-GARCÍA; ELIAS, 2011). Contudo, novos estudos serão necessários para avaliar o papel dessa autotransportadora na patogenicidade de cepas ExPEC.

A análise genômica da UPEC-46 identificou muitos genes de virulência, indicando que ela apresenta características associadas a cepas patogênicas extraintestinais, tais como adesinas, sistemas de aquisição de ferro e genes relacionados à evasão do sistema imunológico. Além disso, como em outras cepas de *E. coli* híbridas, a UPEC-46 exibiu vários genes de virulência relacionados ao patotipo EAEC e outros patotipos de DEC, refletindo o duplo perfil genotípico comumente associado a tais cepas. Nossas análises iniciais mostraram que a UPEC-46 pertence

ao grupo filogenético A e ao ST10. Cepas patogênicas de *E. coli* pertencentes a esse *cluster* têm sido descritas em diversos países (ARAIIS et al., 2018; CAMPOS et al., 2018; GONÇALVES et al., 2016; HERTZ et al., 2016; LIU et al., 2018; MOHSIN et al., 2018; VALIATTI et al., 2020; YAMAJI et al., 2018), incluindo a cepa C555-91 (O78:H10) que causou um surto de ITU em 1991 na Dinamarca e uma cepa de *E. coli* (O153:HNT) isolada de um paciente com ITU em 2016 na França (BOLL et al., 2013; FLAMENT-SIMON et al., 2020).

Além disso, a UPEC-46 apresentou múltiplos genes e fenótipos de resistência a diversos antimicrobianos, incluindo resistência ao trimetoprim, sulfametoxazol e tetraciclina. (SALVADOR, 2006) O fenótipo de resistência a estreptomicina foi confirmado através de ensaios fenotípicos conduzidos nesse estudo (dados não mostrados). Altas taxas de resistência a antibióticos contra isolados de ITU, especialmente as descritas acima são frequentemente relatadas (MOHAMMADZADEH et al., 2019; KOT, 2019; LÓPEZ-BANDA et al., 2014; ZHAO et al., 2020) Em suma, a presença de diversos marcadores de resistência poderia aumentar o potencial patogênico da UPEC-46, permitindo que essa cepa seja uma colonizadora competitiva do trato urinário e intestinal, além de ser menos sujeita à erradicação por tratamento com antibióticos quando comparada a outras cepas bacterianas.

Na análise genômica dos plasmídios presentes na UPEC-46, observou-se que essa cepa apresenta três distintos plasmídios. O plasmídio p46-2 alberga todos os diferentes genes de resistência antimicrobiana encontrada na UPEC-46, enquanto no plasmídio p46-3 estão presentes genes associados à síntese da colicina E1. No estudo de Salvador (2006) os plasmídios p46-2 e p46-3 foram transferidos com sucesso para a cepa receptora *E. coli* MA3456 em ensaios de conjugação, mostrando a relação do plasmídio p46-2 com a resistência a antimicrobianos. Nossas análises genotípicas corroboram com o descrito no estudo anterior, identificando a presença de genes dos *operons pil* e *tra*, além dos genes *mbeA* e *mbeC*, relacionados à transferência plasmidial nesses dois plasmídios.

Em contrapartida, observou-se que o plasmídio p46-1 apresenta uma variedade de genes de virulência associados a EAEC (*aatA*, *pet* e *aap*); entretanto, o gene *aggR*, que codifica o regulador global de genes de virulência de EAEC (DUDLEY et al., 2006), não foi encontrado. Cepas EAEC podem ser classificadas como típicas ou atípicas, baseado na presença ou ausência do gene *aggR*, respectivamente

(KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Cepas EAEC atípicas têm sido frequentemente isoladas em diversos estudos epidemiológicos ao redor do mundo (DIAS et al., 2020; IKUMAPAYI et al., 2017; LOPES, 2015; SARANTUYA et al., 2004; TOKUDA et al., 2010), e o perfil de virulência *aatA*⁺/*aggR*⁻ descrito na UPEC-46 provavelmente pode estar relacionado a essa categoria. Vale ressaltar que em um estudo brasileiro sobre a etiologia da diarreia aguda em crianças e adultos, 26,3% das cepas de EAEC foram positivas para *aggR* (SPANNO et al., 2017). Em outro estudo realizado no Brasil, o gene *aggR* foi detectado em 56,7% das cepas classificadas como EAEC (LIMA et al., 2013). Esses resultados levantam importantes questões sobre as cepas *aatA*⁺/*aggR*⁻, na qual essas poderiam apresentar outras adesinas ou mesmo outro gene regulador que poderia ser responsável pelo padrão AA.

Nesse sentido, ao analisarmos filogeneticamente a UPEC-46, observou-se que essa cepa foi distribuída separadamente em um ramo filogenético agrupado com cepas EAEC atípicas, mostrando uma relação filogenética semelhante com esse grupo de cepas de *E. coli*. Além disso, analisando diferentes cepas do ST10, demonstramos que a UPEC-46 pertenceu a um *cluster* específico contendo cepas de EAEC atípicas isoladas de fezes humanas, apresentando os genes do *operon afp* e o seu gene regulador da família AraC (*afpR*), responsáveis pela biogênese da fímbria AFP (LANG et al., 2018). Os genes do *locus afp* foram localizados no plasmídeo p46-1, junto a outros marcadores de virulência.

Os genes responsáveis pela biogênese da AFP têm aproximadamente 52% de identidade de nucleotídeos com os genes responsáveis por codificar um *pilus* tipo IV, denominado *bundle-forming pili* (BFP), um *pilus* que medeia o fenótipo de aderência localizada em cepas de EPEC típica nas culturas de células epiteliais (DONNENBERG et al., 1992; GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991; SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984). Os *operons afp* e *bfp* têm uma organização gênica semelhante (LANG et al., 2018; TOBE et al., 1999); entretanto, no *operon afp* existe um gene adicional (*afpA2*) que não é necessário para a biogênese de AFP, sendo este ausente no *operon bfp* (LANG et al., 2018). Recentemente, genes que codificam a adesina AFP foram detectados em cepas de EAEC atípicas obtidas de fezes de pacientes com diarreia no Brasil (DIAS et al., 2020) e, embora ainda não tenhamos estudos que mostrem a prevalência dessa adesina em coleções de *E. coli* isoladas de ITU, cepas com marcadores de virulência de EAEC atípicas têm sido isoladas de urina (ABE et al., 2008; NAZEMI et al., 2011). Essas descrições mostram que a prevalência do

operon afp e seu regulador (gene *afpR*) não é exclusiva de cepas EAEC/STEC e EAEC, conforme originalmente descrito por Lang et al. (2018).

Em nossa análise, foi demonstrado que os isolados positivos para AFP identificados nos bancos de genoma pesquisados diferem quanto à presença de fatores associados à virulência. Ao analisar os diferentes grupos de genes de virulência não observamos um perfil de virulência semelhante entre essas cepas. Nesse sentido, dois estudos anteriores pesquisando fatores de virulência em cepas de *E. coli* mostraram resultados semelhantes. Leimbach et al. (2017) ao analisarem o genoma de cepas de *E. coli* comensais e isoladas de mastite em bovinos não observaram uma correlação significativa entre a presença de genes de virulência específicos e cepas MPEC. Stork et al. (2018) ao compararem as características genéticas de diferentes cepas de *E. coli* isoladas de bacteriúria assintomática não observaram correlação de genes associados à virulência com as diferentes cepas analisadas. Assim, as cepas que carregam os genes da biogênese de AFP não podem ser associadas a um único perfil de virulência. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo mostram que a ausência de genes específicos associados a ExPEC, tais como os operons *afa* e *pap*, e a presença de alguns determinantes associados a EAEC (*operon aat* e gene *aap*) poderiam ser usados para distinguir essas cepas de outros patótipos de *E. coli*. Concomitantemente, ao se analisar a filogenia das cepas positivas para AFP, demonstrou-se que essas pertencem a diferentes STs. Isso indica fortemente que o plasmídeo contendo AFP possa ser conjugado pelas cepas de *E. coli* ou mesmo a sequência dessa adesina pode ser transferida horizontalmente por meio de *transposon*, uma vez que em nossas análises genotípicas verificamos a presença de sequências de inserção na estrutura do plasmídeo p46-1 (dados não mostrados).

A ausência dos genes associados as cinco diferentes AAFs (I-V) ou mesmo de adesinas associadas a ExPEC apoia a ideia de que outras adesinas podem estar envolvidas no fenótipo AA na cepa UPEC-46. Nesse sentido a adesina AFP, cujo *locus* correspondente está presente no plasmídeo p46-1, tornou-se uma boa candidata a ser a estrutura fimbrial mediando o padrão AA da UPEC-46, considerando os dados do estudo conduzido por Lang et al. (2018), onde AFP foi associada ao padrão AA em células HEp-2 e a autoagregação bacteriana em isolados de EAEC/STEC (LANG et al., 2018). Naquele estudo, a exclusão completa do *operon afp* e dos genes *afpA* e *afpR* levou à perda de produção de fímbrias nas análises por microscopia eletrônica

e reduziu drasticamente a capacidade dos isolados em aderir a células epiteliais *in vitro*.

Ao analisarmos os efeitos da mutação no gene *afpA* na cepa UPEC-46, observamos uma redução quantitativamente significativa da aderência e ausência do padrão AA nas linhagens celulares HeLa, HT-29 e 5637. De fato, os efeitos da mutação do gene *afpA* confirmaram que essa adesina é importante para a adesão e o estabelecimento do padrão AA na UPEC-46.

A partir da construção da cepa mutante em *afpA* (UPEC-46::*afpA*), foi possível obter um soro anti-UPEC-46 e adsorvê-lo exaustivamente contra as células dessa cepa. Isso resultou em um soro adsorvido específico anti-AFP, o qual reconheceu uma banda proteica de aproximadamente 21 kDa (peso molecular semelhante a proteína AfpA) no extrato bacteriano da cepa selvagem. Além disso, nas análises por microscopia eletrônica esse soro reagiu com estruturas semelhantes aos *pili* na superfície bacteriana das cepas selvagem e complementada em *afpA*, não sendo observado tal reconhecimento na cepa mutante em *afpA*. Os dados obtidos corroboram com os descritos por Lang et al. (2018), em que a microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de estruturas semelhantes aos *pili* em bactérias de ambas as cepas AFP positivas (cepas selvagem e complementada em *afpA*) e, apresentou-se de forma reduzida na cepa mutante em *afpA*. Nesse sentido, este é o primeiro estudo que mostra a ultraestrutura de AFP, por meio da produção de um soro específico para essa adesina, além de demonstrarmos o papel dessa adesina no estabelecimento da adesão em linhagens celulares de bexiga humana e em células epiteliais intestinais.

No contexto dos resultados obtidos até esse momento, hipotetizamos que a adesina AFP poderia estar relacionada com a capacidade de colonização do trato intestinal e urinário, estando conseqüentemente associada à diarreia e ITU, respectivamente. Assim, para que a relação de AFP com a uropatogênese e a colonização intestinal fosse mais bem compreendida, partimos para a identificação de outras possíveis adesinas que poderiam também estar relacionadas ao estabelecimento do padrão AA em culturas de células epiteliais. Para isso, a cepa UPEC-46 foi mutagenizada pelo *transposoma* *EZ-Tn5* <R6K γ ori/KAN-2> e uma biblioteca de mutantes foi obtida e analisada pelo teste qualitativo de adesão. A análise do local de inserção dos mutantes selecionados os classificou em três grupos

distintos, incluindo genes associados a síntese do LPS, genes relacionados ao metabolismo/transportadores celulares e associados a adesinas.

Ao analisarmos os genes biossintéticos do LPS verificamos que a mutação nesses genes não afetou a expressão da fímbria tipo 1 e o crescimento bacteriano no meio LB, mas levou à diminuição significativa da motilidade. A proteína RfaG está envolvido na biossíntese de LPS, conectando o núcleo interno e externo, enquanto RfaL participa da montagem do antígeno O (RAETZ; WHITFIELD, 2002). Em particular, foi relatado que o antígeno O do LPS contribui para a motilidade de várias bactérias Gram negativas (GYGI et al., 1995; MIRELES; TOGUCHI; HARSHEY, 2001). As proteínas RfaG e RfaL conferem hidrofobicidade à superfície da célula e, além disso, reduzem a tensão superficial entre o ágar e a superfície da célula prejudicando a motilidade (HARSHEY, 2003). Foi descrito por Raetz e Whitfield (2002) que nocautes nessas proteínas também prejudicam a motilidade natatória, sugerindo que a montagem e função flagelar podem ser influenciadas por estruturas de LPS alteradas. Além disso, esses genes do LPS também estão relacionados a adesão bacteriana e formação de biofilme (AGUINIGA et al., 2016; HADJIFRANGISKOU et al., 2012). Portanto, os genes envolvidos na síntese de LPS podem afetar a integridade celular da membrana externa que, por sua vez, pode afetar a adesão e formação de biofilme.

Quatro inserções do *transposon* (33% do total) ocorreram em genes do metabolismo/transportadores celulares (*yahK*, *pyrB*, *nhaA* e *pfkL*) e estes se mostraram essenciais para a adesão bacteriana. O gene *yahK* codifica uma proteína do metabolismo e catalisa a redução de uma ampla gama de aldeídos em seus álcoois correspondentes (PICK et al., 2013). O gene *pyrB* codifica a enzima aspartato carbamoiltransferase, a qual cataliza a síntese dos nucleotídeos de pirimidina (KONIGSBERG; HENDERSON, 1983). O gene *nhaA* é responsável por codificar o antiportador Na^+/H^+ que expulsa sódio em troca de prótons de hidrogênio externos. Esse antiportador está localizado na membrana citoplasmática, mantendo a homeostase dos íons Na^+ e H^+ no citoplasma (TAGLICHT; PADAN; SCHULDINER, 1991). Por fim, o gene *pfkL*, codifica a enzima fosfofrutoquinase, na qual participa da via da glicólise, catalisando a fosforilação de frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato por meio do consumo de ATP, participando da primeira etapa da via da glicólise (PARDUCCI et al., 2006). Alguns estudos vêm demonstrando que a mutagênese em alguns genes envolvidos em processos metabólicos bacterianos pode interferir na

capacidade da bactéria em aderir a superfícies bióticas e/ou abióticas ou até mesmo na formação de biofilme (HADJIFRANGISKOU et al., 2012; LI; WANG, 2011; MONFARDINI, 2018). Muitas vezes, a mutagênese desses genes pode causar dificuldade no metabolismo de elementos essenciais, de se multiplicar ou até mesmo na perda da capacidade biossintética de determinada adesina essencial.

Por fim, seis inserções do *transposon* (50% do total) ocorreram em genes associados a duas importantes adesinas, a fímbria tipo 1 e o *pilus* AFP, os quais se mostram essenciais para a adesão bacteriana e o estabelecimento do padrão AA na linhagem celular HeLa. Os clones identificados nessa biblioteca que apresentaram inserção nos genes relacionados à AFP corroboram os dados obtidos com a mutagênese em *afpA* (construção UPEC-46::*afpA*), reforçando o papel dessa fímbria na adesão da cepa UPEC-46. A presença da fímbria tipo 1 tem grande importância no estabelecimento da adesão e formação de biofilme em cepas UPEC (LÜTHJE; BRAUNER, 2014; MELICAN et al., 2011). Moreira et al. (2003) relatam a importância dessa fímbria em cepas do patótipo EAEC, incluindo a cepa protótipo 042; além disto, a construção de um mutante em *fimD* promoveu uma diminuição acentuada do padrão AA e na formação do biofilme. A UPEC-46 apresenta o *operon* completo da fímbria tipo 1 e expressa essa fímbria, conforme detectado pela aglutinação de eritrócitos de cobaia (SALVADOR, 2006) e por meio do ensaio aglutinação em *S. cerevisiae*. O clone C441 identificado na biblioteca de mutantes com o *transposon* apresentou a inserção no gene *fimI*, na qual tem sido descrito como necessário para a biossíntese da fímbria tipo 1 em *E. coli* (VALENSKI et al., 2003).

A partir dos resultados obtidos com a biblioteca de mutantes, partimos para uma análise mais aprofundada do papel dessas adesinas na adesão/invasão bacteriana e na colonização intestinal e do trato urinário. Para isso, foi realizada a mutagênese do gene *fimH* na cepa UPEC::*afpA*, resultando na cepa duplo mutante nos genes *afpA* e *fimH*, denominada UPEC-46::*afpA*::*fimH*. Todas as construções obtidas anteriormente para o gene *afpA* também foram utilizadas para as análises subsequentes. A capacidade de adesão/invasão a células epiteliais é considerada a primeira etapa para o estabelecimento de doenças infecciosas, e esses fenótipos são mediados pela expressão de adesinas fímbricas ou afímbricas (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014; OWRANGI et al., 2018). Desta forma, os ensaios realizados mostraram que as adesinas AFP e fímbria tipo 1 desempenham importante papel sinérgico na adesão em diferentes linhagens celulares. Alguns trabalhos têm

apresentado robustas evidências de uma ação sinérgica de *operons* fimbriais durante o estabelecimento da adesão e colonização em cepas de *E. coli* (MELICAN et al., 2011; TSENG et al., 2020). Por outro lado, embora trabalhos tenham demonstrado o papel da fímbria tipo 1 para a invasão (MARTINEZ et al., 2000; SARKAR et al., 2018), esse é o primeiro estudo a demonstrar o papel de AFP na invasão de células HeLa, HT-29 e 5637. Assim, a presença dessas duas adesinas se complementam nas etapas de adesão/invasão, contribuindo para a patogênese da cepa UPEC-46.

O tratamento com o antibiótico estreptomicina tem sido utilizado em estudos *in vivo* da interação de cepas de *E. coli* patogênicas com o epitélio do intestino, a fim de eliminar microrganismos na qual possam vir a competir com a cepa estudada, facilitando assim a colonização intestinal (HARRINGTON et al., 2009; ROYAN et al., 2010). Embora isso possa trazer limitações ao modelo murino de colonização, pois impacta na composição e consequentemente na homeostase intestinal, esse procedimento é importante já que muitos camundongos adultos podem ser resistentes a colonização por cepas de *E. coli* (DUPONT et al., 2016).

Sendo assim, no presente estudo utilizamos o modelo de camundongos tratados com estreptomicina para avaliar o papel das adesinas AFP e fímbria tipo 1 na colonização intestinal da UPEC-46. Observamos que tais adesinas desempenham um importante papel na capacidade da cepa em se aderir e permanecer no intestino durante os 14 dias avaliados. A cepa UPEC-46, colonizou de forma eficiente o trato intestinal, sem, no entanto, levar o camundongo a apresentar sinais clínicos de diarreia. Cabe salientar que o modelo murino utilizado não é um modelo de diarreia causada por *E. coli*. A utilização de um inóculo de baixa concentração bacteriana ($1,0 \times 10^3$ UFC) da UPEC-46 foi capaz de promover uma eficiente colonização intestinal, de forma bastante semelhante ao observado para a cepa protótipo EAEC 042 (HARRINGTON et al., 2009) e para a cepa BA589, uma cepa de EPEC atípica positiva ao padrão AA e à proteína Pic, diretamente envolvida na colonização intestinal (ABREU et al., 2016).

Analisando a cinética da colonização, notamos que a mutação em *afpA* (UPEC-46::*afpA*) causou a diminuição da carga cumulativa de colonização em aproximadamente 40 vezes quando comparada à cepa selvagem. Esse resultado indica o papel de AFP para a colonização intestinal, sendo o primeiro trabalho a mostrar a importância dessa adesina nessa etapa da patogênese. Curiosamente, a dupla mutação nos genes *afpA* e *fimH* levou à diminuição drástica no estabelecimento

da colonização intestinal, tanto no curto quanto no longo prazo. Sarkar et al. (2018) demonstraram que a deleção do *operon* da fímbria tipo 1, ao longo do período analisado, causou diferenças significativas da colonização intestinal em camundongos tratados com estreptomicina. Além disso, McCormick et al. (1989) também relataram resultado semelhante ao avaliarem a cepa de *E. coli* comensal F-18 e seu mutante na fímbria tipo 1. No geral, os resultados obtidos para a cepa UPEC-46 e construções genéticas derivadas indicam um efeito sinérgico de AFP e fímbria tipo 1, considerando que a dupla mutação em *afpA/fimH* (UPEC-46::*afpA::fimH*) reduziu a carga de colonização em aproximadamente 10^6 vezes quando comparada à cepa selvagem, sendo que a cepa duplo mutante foi completamente abolida das fezes de alguns camundongos antes do final do experimento (dados não mostrados).

Ao analisar as porções intestinais, observou-se que a UPEC-46 foi capaz de colonizar as partes distais do intestino do camundongo (íleo e principalmente o cólon). Esta colonização específica de nicho foi relatada para a cepa Nissle 1917 e outras *E. coli* patogênicas (MEADOR et al., 2014). Em cepas do patotipo EAEC o local de colonização intestinal inclui principalmente o cólon e a região terminal do íleo (HEBBELSTRUP JENSEN et al., 2014). Sendo assim, a presença desses sítios específicos é importante, pois podem facilitar as interações da UPEC-46 com outros patógenos intestinais, permitindo o compartilhamento de características associadas ao metabolismo e virulência (O'BRIEN et al., 2017).

As infecções bacterianas do trato urinário podem ser avaliadas de forma quantitativa por meio da determinação da carga bacteriana em diferentes tempos de pós-infecção. Adicionalmente, por meio de uma variedade de técnicas microscópicas é possível a observação da progressão da colonização e infecção bacteriana nos tecidos da bexiga e rins. O modelo animal de ITU ascendente em camundongos da linhagem C57BL/6 tem sido amplamente utilizado e se mostrado eficiente para caracterizar o potencial uropatogênico em diferentes cepas de *E. coli* (HUNG; DODSON; HULTGREN, 2009).

Ao avaliarmos o papel de AFP na colonização da bexiga e rins, foi observado que após o inóculo com as cepas UPEC-46 e UPEC-46::*afpA* não houve diferenças estatisticamente significativas na colonização da bexiga, embora a carga bacteriana média tenha sido reduzida em torno de 50 vezes. Por outro lado, a adesina AFP mostrou um papel mais significativo na colonização dos rins, sendo que a cepa UPEC-46::*afpA* foi incapaz de colonizar esses órgãos. Assim, tal como evidenciado na

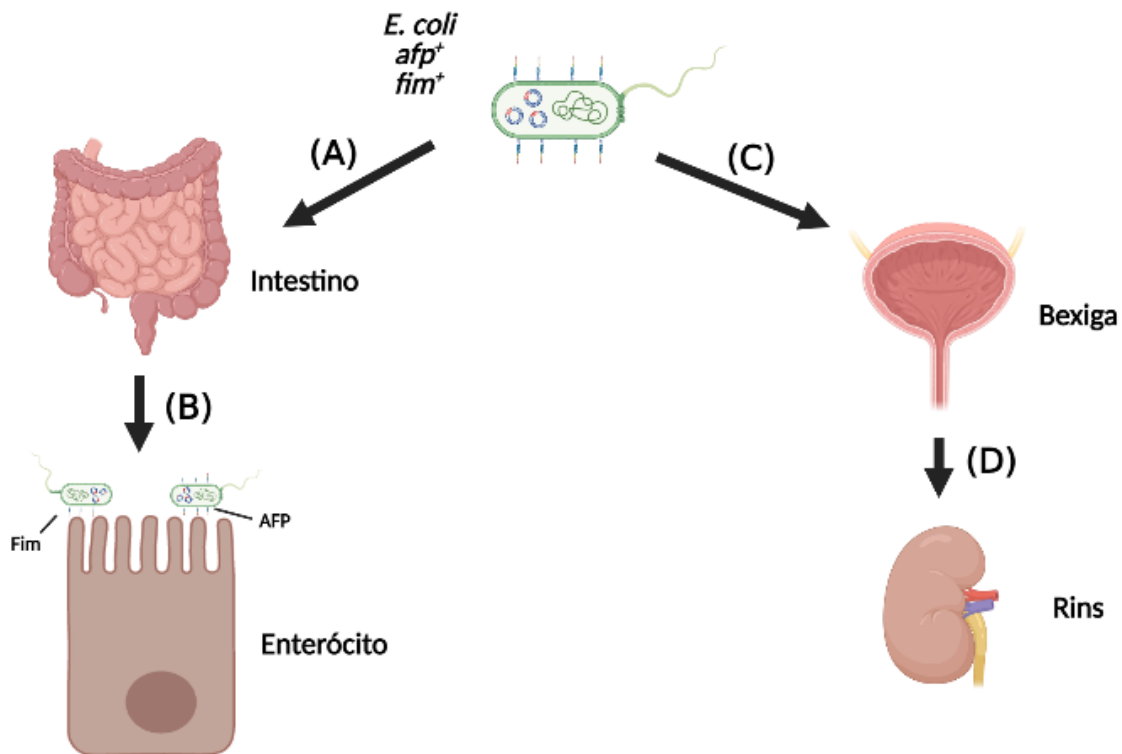
colonização intestinal, esse é o primeiro trabalho mostrando a importância da adesina AFP na uropatogênese bacteriana. Concomitantemente, ao analisarmos a cepa duplo mutante UPEC-46::*afpA::fimH*, observou-se que a mutação em *fimH* reduziu de forma significativa a colonização da bexiga. Esse dado é concordante com o descrito por Boll et al. (2013) estudando a cepa EAEC C555-91, isolada do surto de ITU na Dinamarca, no mesmo modelo murino de ITU empregado no presente projeto. Esses autores sugeriram que a aderência da cepa C555-91 à bexiga dos camundongos era mediada principalmente pela fímbria tipo 1. Portanto, cepas positivas as adesinas AFP e fímbria tipo 1 podem apresentar a capacidade de colonizar bexiga e rins, podendo causar sérios danos a esses tecidos do epitélio urinário e muitas vezes evoluir para o quadro de urosepse.

Nas análises de microscopia eletrônica da bexiga de camundongos colonizados com a cepa UPEC-46 foram observadas estruturas semelhantes a IBCs. Estudos anteriores têm mostrado que as IBCs são capazes de resistir a diversos processos de eliminação bacteriana, onde podem permanecer latentes em um hospedeiro e resultar em reinfecção (MYSOREKAR; HULTGREN, 2006). Nesse sentido, a cepa UPEC-46 apresenta características uropatogênicas associadas a cepas do patotipo UPEC, demonstrando capacidade de persistir na bexiga e rins dos animais infectados por períodos de até 72 h pós-infecção. Por fim, as análises por microscopia eletrônica das diferentes construções em AFP e fímbria tipo 1 estão em processo de finalização e os resultados serão expostos no artigo a ser publicado a partir dessa tese.

Coletivamente, os dados de caracterização genotípica, fenotípica e análises *in vitro* e *in vivo* realizados no presente estudo sugerem que a patogênese da cepa UPEC-46 resulta do papel sinérgico das adesinas AFP e fímbria tipo 1, as quais medeiam principalmente a adesão bacteriana e a capacidade de colonização do trato urinário e epitélio intestinal (**Figura 53**). Especificamente, a interação bacteriana com esses epitélios poderia resultar na disseminação dessas bactérias na corrente sanguínea. Sabe-se que vários fatores de virulência presentes na cepa UPEC-46, tais como o gene *iss* e a cápsula do grupo IV, têm sido descritos como importantes fatores para a resistência à ação bactericida do soro humano (BINNS; DAVIES; HARDY, 1979; BIRAN; ROSENSHINE; RON, 2020). Além disso, novos achados descritos por Moraes et al. (2020) mostram que a proteína dispersina (codificada pelo gene *aap*) atua na ligação ao componente de matriz extracelular laminina gerando plasmina

ativa, a qual pode facilitar a disseminação de cepas de *E. coli* a partir da colonização local para outros tecidos e órgãos. Neste contexto, a presença das adesinas AFP e fímbria tipo 1 em isolados de *E. coli* poderia promover uma capacidade patogênica híbrida dessas cepas, permitindo que essas colonizem tanto o trato urinário quanto o intestinal de seus hospedeiros.

Figura 53 - Modelo esquemático do papel proposto para cepas positivas as adesinas AFP e fímbria tipo 1 na colonização bacteriana



Cepas de *E. coli* positivas para as adesinas AFP e fímbria tipo 1 (Fim) podem ter a capacidade tanto de colonizar o trato intestinal quanto o trato urinário. **(A)** No trato intestinal, essas cepas atingem e colonizam a porção final do intestino delgado (íleo) e com mais frequência a porção do intestino grosso (cólon). **(B)** As adesinas AFP e Fim são responsáveis pela adesão bacteriana aos enterócitos, permitindo que essas cepas possam colonizar o intestino. **(C)** No trato urinário, cepas de *E. coli* positivas a AFP e Fim provêm da contaminação da área periuretral e conseqüentemente, essas cepas colonizam essa região e ascendem para a bexiga. Na bexiga, as adesinas AFP e Fim são responsáveis pela aderência a células epiteliais, e conseqüentemente a colonização desse órgão. **(D)** Essas bactérias podem ascender aos rins, onde tais adesinas facilitam o processo de adesão às células renais e colonização desse órgão.

6 CONCLUSÕES

- I. A UPEC-46 apresentou importantes características fenotípicas e genotípicas associadas ao patotipo EAEC, mesmo tendo sido isolada de um quadro de ITU e carreando alguns genes de ExPEC;
- II. Análises filogenéticas detalhadas mostraram a estreita relação da UPEC-46 com cepas pertencentes ao patotipo EAEC atípica;
- III. O padrão AA produzido pela UPEC-46 é mediado pela adesina *aggregate forming pilus* (AFP), a qual desempenha importante papel na adesão a células humanas epiteliais intestinais e de bexiga, bem como na colonização intestinal e do trato urinário em modelos murinos;
- IV. A fímbria tipo 1 tem papel sinérgico com AFP nesses fenótipos da UPEC-46.

Dessa forma, conclui-se que a cepa UPEC-46 é uma *E. coli* híbrida patogênica (EAEC atípica/UPEC) que expressa a fímbria AFP e que essa adesina tem papel fundamental nos processos de adesão *in vitro* e de colonização intestinal e do trato urinário *in vivo*.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M.; SALVADOR, F. A.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, M. A.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MACHADO, A. M.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R. T.; GOMES, T. A. T. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, p. 397-406, 2008.
- ABREU, A. G.; ABE, C. M.; NUNES, K. O.; MORAES, C. T.; CHAVEZ-DUEÑAS, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; BARBOSA, A. S.; PIAZZA, R. M.; 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. 452, 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.
- AGUINIGA, L. M.; YAGGIE, R. E.; SCHAEFFER, A. J.; KLUMPP, D. J. Lipopolysaccharide domains modulate urovirulence. **Infect Immun**, v. 84, p. 3131-3140, 2016.
- AIJUKA, M.; SANTIAGO, A. E.; GIRÓN, J. A.; NATARO, J. P.; BUYS, E. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* is the predominant diarrheagenic *E. coli* pathotype among irrigation water and food sources in South Africa. **Int J Food Microbiol**, v. 278, p. 44-51, 2018.
- ANDERSON, G. G.; PALERMO, J. J.; SCHILLING, J. D.; ROTH, R.; HEUSER, J.; HULTGREN, S. J. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. **Science**, v. 301, p. 105-107, 2003.
- 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, 2017.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 68 p.

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

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

ANDRADE, J. A.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to the ileal and colonic mucosa: an *in vitro* study utilizing the scanning electron microscopy. **Arq Gastroenterol**, v. 48, p. 199-204, 2011.

ANDRADE, J. A.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Pathophysiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infection: an experimental model utilizing transmission electron microscopy. **Arq Gastroenterol**, v. 47, p. 306-312, 2010.

ANG, C. W.; BOUTS, A. H.; ROSSEN, J. W.; VAN DER KUIP, M.; VAN HEERDE, M.; BÖKENKAMP, A. Diarrhea, urosepsis and hemolytic uremic syndrome caused by the same heteropathogenic *Escherichia coli* strain. **Pediatr Infect Dis J**, v. 35, p. 1045-1047, 2016.

ANTÃO, E. M.; GLODDE, S.; LI, G.; SHARIFI, R.; HOMEIER, T.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; BETHE, A.; PHILIPP, H. C.; PREISINGER, R.; WIELER, L. H.; EWERS, C. The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Microb Pathog**, v. 45, p. 361-369, 2008.

APPLEYARD, R. K. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. **Genetics**, v. 39, p. 440-452, 1954.

ARAI, L. R.; BARBOSA, A. V.; ANDRADE, J. R. C.; GOMES, T. A. T.; ASENSI, M. D.; AIRES, C. A. M.; CERQUEIRA, A. M. F. Zoonotic potential of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from puppies with diarrhoea in Brazil. **Vet Microbiol**, v. 227, p. 45-51, 2018.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 3396-3399, 2007.

ARNDT, D.; GRANT, J. R.; MARCU, A.; SAJED, T.; PON, A.; LIANG, Y.; WISHART, D. S. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic Acids Res**, v. 44, p. 16-21, 2016.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York: Wiley Interscience, 1987.

AVELINO, F.; SALDAÑA, Z.; ISLAM, S.; MONTEIRO-NETO, V.; DALL'AGNOL, M.; ESLAVA, C. A.; GIRÓN, J. A. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the E. coli common pilus when adhering to cultured epithelial cells. **Int J Med Microbiol**, v. 300, p. 440-448, 2010.

BANGAR, R.; MAMATHA, B. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, south India. **Indian J Med Sci**, v. 62, p. 8-12, 2008.

BARBER, A. E.; NORTON, J. P.; WILES, T. J.; MULVEY, M. A. Strengths and limitations of model systems for the study of urinary tract infections and related pathologies. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 80, p. 351-367, 2016.

BARNHART, M. M.; CHAPMAN, M. R. Curli biogenesis and function. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 131-147, 2006.

BAUDRY, B.; SAVARINO, S. J.; VIAL, P.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J Infect Dis**, v. 161, p. 1249-1251, 1990.

BEGHAIN, J.; BRIDIER-NAHMIAS, A.; LE NAGARD, H.; DENAMUR, E.; CLERMONT, O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate *in silico* method for *Escherichia* genus strain phylotyping. **Microb Genom**, v. 4, e000192, 2018.

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

BEN SALEM-BEN NEJMA, I.; HASSINE ZAAFRANE, M.; HASSINE, F.; SDIRI-LOULIZI, K.; BEN SAID, M.; AOUNI, M.; MZOUGHJI, R. Etiology of acute diarrhea in tunisian children with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence and identification of *E. coli* virulence markers. **Iran J Public Health**, v. 43, p. 947-960, 2014.

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

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

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

BIAN, Z.; BRAUNER, A.; LI, Y.; NORMARK, S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. **J Infect Dis**, v. 181, p. 602-612, 2000.

BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCK, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet Infect Dis**, v. 11, p. 671-676, 2011.

BIELASZEWSKA, M.; SCHILLER, R.; LAMMERS, L.; BAUWENS, A.; FRUTH, A.; MIDDENDORF, B.; SCHMIDT, M. A.; TARR, P. I.; DOBRINDT, U.; KARCH, H.; MELLMANN, A. Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. **EMBO Mol Med**, v. 6, p. 347-357, 2014.

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 681473, 2012.

BINNS, M. M.; DAVIES, D. L.; HARDY, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, v. 279, p. 778-781, 1979.

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.

BOISEN, N.; HANSEN, A. M.; MELTON-CELSA, A. R.; ZANGARI, T.; MORTENSEN, N. P.; KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D.; NATARO, J. P. The presence of the pAA plasmid in the German O104:H4 Shiga toxin type 2a (Stx2a)-producing enteroaggregative *Escherichia coli* strain promotes the translocation of Stx2a across an epithelial cell monolayer. **J Infect Dis**, v. 210, p. 1909-1919, 2014.

BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect Immun**, v. 76, p. 3281-3292, 2008.

BOISEN, N.; ØSTERLUND, M. T.; JOENSEN, K. G.; SANTIAGO, A. E.; MANDOMANDO, I.; CRAVIOTO, A.; CHATTAWAY, M. A.; GONYAR, L. A.; OVERBALLE-PETERSEN, S.; STINE, O. C.; RASKO, D. A.; SCHEUTZ, F.; NATARO, J. P. Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): genomic characterization of epidemiological EAEC strains. **PLoS Negl Trop Dis**, v.14, p. e0008613, 2020.

BOLL, E. J.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; OLESEN, B.; STAHLHUT, S. G.; KROGFELT, K. A. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. **Infect Immun**, v. 81, p. 1164-1171, 2013.

BOOP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A.; FIELDS, P. I. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2003. cap. 42, v. 1, p. 654-700.

BRAGA, R. L. L.; PEREIRA, A.; SANTOS, P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; ROSA, A. *Ex vivo* model of rabbit intestinal epithelium applied to the study of colonization by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Arq Gastroenterol**, v. 54, p. 130-134, 2017.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; DOS SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

BURGOS, T. N. ***Escherichia coli* enteroagregativa em pacientes HIV positivos com diarréia no norte do Paraná – Brasil**. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2017.

BÂRZU, S.; BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; PHALIPON, A.; SANSONETTI, P.; PARSOT, C. Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. **Infect Immun**, v. 65, p. 1599-1605, 1997.

BÄCKHED, F.; ALSÉN, B.; ROCHE, N.; ANGSTRÖM, J.; VON EULER, A.; BREIMER, M. E.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B.; TENEBERG, S.; RICHTER-DAHLFORS, A. Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. **J Biol Chem**, v. 277, p. 18198-18205, 2002.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 421, 2009.

CAMPOS, A. C. C.; ANDRADE, N. L.; FERDOUS, M.; CHLEBOWICZ, M. A.; SANTOS, C. C.; CORREAL, J.; LO TEN FOE, J. R.; ROSA, A.; DAMASCO, P. V.; FRIEDRICH, A. W.; ROSSEN, J. Comprehensive molecular characterization of *Escherichia coli* isolates from urine samples of hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Front Microbiol**, v. 9, p. 243, 2018.

CARATTOLI, A.; ZANKARI, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; VOLDBY LARSEN, M.; LUND, O.; VILLA, L.; MØLLER AARESTRUP, F.; HASMAN, H. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 3895-3903, 2014.

CARVER, T.; THOMSON, N.; BLEASBY, A.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. **Bioinformatics**, v. 25, p. 119-120, 2009.

CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHÉ, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBÈS, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin biology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 71, p. 158-229, 2007.

CASTONGUAY, M. H.; VAN DER SCHAAF, S.; KOESTER, W.; KROONEMAN, J.; VAN DER MEER, W.; HARMSSEN, H.; LANDINI, P. Biofilm formation by *Escherichia*

coli is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. **Res Microbiol**, v. 157, p. 471-478, 2006.

CHANG, A. C.; COHEN, S. N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. **J Bacteriol**, v. 134, p. 1141-1156, 1978.

CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infect Genet Evol**, v. 12, p. 214-226, 2012.

CHAUDHURI, R. R.; SEBAIHIA, M.; HOBMAN, J. L.; WEBBER, M. A.; LEYTON, D. L.; GOLDBERG, M. D.; CUNNINGHAM, A. F.; SCOTT-TUCKER, A.; FERGUSON, P. R.; THOMAS, C. M.; FRANKEL, G.; TANG, C. M.; DUDLEY, E. G.; ROBERTS, I. S.; RASKO, D. A.; PALLEN, M. J.; PARKHILL, J.; NATARO, J. P.; THOMSON, N. R.; HENDERSON, I. R. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, p. e8801, 2010.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nat Protoc**, v. 1, p. 1852-1858, 2006.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71-87, 2012.

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.; DIXIT, O.; VANGCHHIA, B.; CONDAMINE, B.; DION, S.; BRIDIER-NAHMIAS, 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.

COBELJIĆ, M.; MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ, B.; PAUNOVIĆ-TODOSIJEVIĆ, D.; VELICKOVIĆ, Z.; LEPSANOVIĆ, Z.; ZEC, N.; SAVIĆ, D.; ILIĆ, R.; KONSTANTINOVIĆ, S.; JOVANOVIĆ, B.; KOSTIĆ, V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiol Infect**, v. 117, p. 11-16, 1996.

COGGON, C. F.; JIANG, A.; GOH, K.; HENDERSON, I. R.; SCHEMBRI, M. A.; WELLS, T. J. A novel method of serum resistance by *Escherichia coli* that causes urosepsis. **mBio**, v. 9, p. e00920-18, 2018.

CORDEIRO, M. A.; WERLE, C. H.; MILANEZ, G. P.; YANO, T. Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. **Braz J Microbiol**, v. 47, p. 414-416, 2016.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CROUCHER, N. J.; PAGE, A. J.; CONNOR, T. R.; DELANEY, A. J.; KEANE, J. A.; BENTLEY, S. D.; PARKHILL, J.; HARRIS, S. R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. **Nucleic Acids Res**, v. 43, p. e15, 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.

CZECZULIN, J. R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 65, p. 4135-4145, 1997.

DA SILVA, C. R.; SANCHES, M. S.; MACEDO, K. H.; DAMBROZIO, A.; DA ROCHA, S.; NAVARRO, A.; PELAYO, J. S. Molecular and phenotypic characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from groundwater in rural areas in southern Brazil. **J Water Health**, v. 17, p. 597-608, 2019.

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

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 6640-6645, 2000.

DE LUNA, M.; SCOTT-TUCKER, A.; DESVAUX, M.; FERGUSON, P.; MORIN, N. P.; DUDLEY, E. G.; TURNER, S.; NATARO, J. P.; OWEN, P.; HENDERSON, I. R. The *Escherichia coli* biofilm-promoting protein Antigen 43 does not contribute to intestinal colonization. **FEMS Microbiol Lett**, v. 284, p. 237-246, 2008.

DESROCHES, M.; CLERMONT, O.; LAFEUILLADE, B.; RODRIGUEZ, C.; DARTY, M.; ROYER, G.; BOUVET, O.; OUNNOUGHENE, N.; NOIZAT-PIRENNE, F.; DENAMUR, E.; DECOUSSER, J. W. Genotypic and phenotypic characteristics of *Escherichia coli* involved in transfusion-transmitted bacterial infections: implications for preventive strategies. **Transfusion**, v. 58, p. 1940-1950, 2018.

DIAS, R. C. B.; DOS SANTOS, B. C.; DOS SANTOS, L. F.; VIEIRA, M. A.; YAMATOOGI, R. S.; MONDELLI, A. L.; SADATSUNE, T.; SFORCIN, J. M.; GOMES, T. A.; HERNANDES, R. T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **APMIS**, v. 124, p. 299-308, 2016.

DIAS, R. C. B.; TANABE, R. H. S.; VIEIRA, M. A.; CERGOLE-NOVELLA, M. C.; DOS SANTOS, L. F.; GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R. T. Analysis of the virulence profile and phenotypic features of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated from diarrheal patients in Brazil. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 22, p.144, 2020.

DOBRINDT, U.; HOCHHUT, B.; HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, p. 414-424, 2004.

DONNENBERG, M. S.; GIRÓN, J. A.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Mol Microbiol**, v. 6, p. 3427-3437, 1992.

DUDLEY, E. G.; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MORIN, N. P.; NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 61, p. 1267-1282, 2006.

DUPONT, A.; SOMMER, F.; ZHANG, K.; REPNIK, U.; BASIC, M.; BLEICH, A.; KÜHNEL, M.; BÄCKHED, F.; LITVAK, Y.; FULDE, M.; ROSENSHINE, I.; HORNEF, M. W. Age-dependent susceptibility to enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection in mice. **PLoS Pathog**, v. 12, p. e1005616, 2016.

DUTTA, P. R.; CAPPELLO, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; NATARO, J. P. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. **Infect Immun**, v. 70, p. 7105-7113, 2002.

ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA, S. K.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol Infect**, v. 129, p. 49-55, 2002.

ELLIOTT, S. J.; KAPER, J. B. Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. **Microb Pathog**, v. 23, p. 113-118, 1997.

ELLIOTT, S. J.; SRINIVAS, S.; ALBERT, M. J.; ALAM, K.; ROBINS-BROWNE, R. M.; GUNZBURG, S. T.; MEE, B. J.; CHANG, B. J. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. **Infect Immun**, v. 66, p. 2040-2051, 1998.

ERMERT, L.; ROUSSEAU, S.; SCHÜTTE, H.; BIRKEMEYER, R. G.; GRIMMINGER, F.; BHAKDI, S.; DUNCKER, H. R.; SEEGER, W. Induction of severe vascular leakage by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in perfused rabbit lungs. **Lab Invest**, v. 66, p. 362-369, 1992.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CZECZULIN, 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.

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

ETO, D. S.; JONES, T. A.; SUNDSBAK, J. L.; MULVEY, M. A. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. **PLoS Pathog**, v. 3, p. e100, 2007.

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4th ed. New York: Elsevier; 1986.

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

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

FLAMENT-SIMON, S. C.; NICOLAS-CHANOINE, M. H.; GARCÍA, V.; DUPRILOT, M.; MAYER, N.; ALONSO, M. P.; GARCÍA-MENIÑO, I.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Clonal structure, virulence factor-encoding genes and antibiotic resistance of antibiotics. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, p. 161, 2020.

FLORES-MIRELES, A. L.; WALKER, J. N.; CAPARON, M.; HULTGREN, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, p. 269-284, 2015.

FORSYTH, V. S.; ARMBRUSTER, C. E.; SMITH, S. N.; PIRANI, A.; SPRINGMAN, A. C.; WALTERS, M. S.; NIELUBOWICZ, G. R.; HIMPSL, S. D.; SNITKIN, E. S.; MOBLEY, H. Rapid growth of uropathogenic *Escherichia coli* during human urinary tract infection. **mBio**, v. 9, p. e00186-18, 2018.

FOXMAN, B.; BROWN, P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. **Infect Dis Clin North Am**, v. 17, p. 227-241, 2003.

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **Am J Med**, v. 113 Suppl 1A, p. 5S-13S, 2002.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nat Rev Urol**, v. 7, p. 653-660, 2010.

FREIRE, C. A.; SANTOS, A.; 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.

- FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Curr Microbiol**, v. 56, p. 474-480, 2008.
- GARCIA, E. C.; BRUMBAUGH, A. R.; MOBLEY, H. L. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. **Infect Immun**, v. 79, p. 1225-1235, 2011.
- GARNETT, J. A.; MARTÍNEZ-SANTOS, V. I.; SALDAÑA, Z.; PAPE, T.; HAWTHORNE, W.; CHAN, J.; SIMPSON, P. J.; COTA, E.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A.; MATTHEWS, S. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, p. 3950-3955, 2012.
- GARÉNAUX, A.; CAZA, M.; DOZOIS, C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Vet Microbiol**, v. 153, p. 89-98, 2011.
- GERSTEL, U.; RÖMLING, U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. **Environ Microbiol**, v. 3, p. 638-648, 2001.
- GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, p. 710-713, 1991.
- GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C.; GUTH, B. E.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, L. C.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz J Microbiol**, v. 47 Suppl 1, p. 3-30, 2016.
- GOMEZ, H. F.; MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DUPONT, H. L. Intestinal immune response of volunteers ingesting a strain of enteroadherent (HEp-2 cell-adherent) *Escherichia coli*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 2, p. 10-13, 1995.
- GONÇALVES, L. F.; DE OLIVEIRA MARTINS-JÚNIOR, P.; DE MELO, A.; DA SILVA, R.; DE PAULO MARTINS, V.; PITONDO-SILVA, A.; DE CAMPOS, T. A. Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 6, p. 1-4, 2016.
- GORDON, D. M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environ Microbiol**, v. 10, p. 2484-2496, 2008.
- GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B.; MOORE, S. R.; ORIÁ, M. O.; LIMA, A. A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutr Rev**, v. 66, p. 487-505, 2008.
- GUIRAL, E.; PONS, M. J.; VUBIL, D.; MARÍ-ALMIRALL, M.; SIGAÚQUE, B.; SOTO, S. M.; ALONSO, P. L.; RUIZ, J.; VILA, J.; MANDOMANDO, I. Epidemiology and

molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates harboring blaCTX-M group 1 extended-spectrum β -lactamases causing bacteremia and urinary tract infection in Manhiça, Mozambique. **Infect Drug Resist**, v. 11, p. 927-936, 2018.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, p. 1072-1075, 2013.

GYGI, D.; RAHMAN, M. M.; LAI, H. C.; CARLSON, R.; GUARD-PETTER, J.; HUGHES, C. A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis*. **Mol Microbiol**, v. 17, p. 1167-1175, 1995.

HADJIFRANGISKOU, M.; GU, A. P.; PINKNER, J. S.; KOSTAKIOTI, M.; ZHANG, E. W.; GREENE, S. E.; HULTGREN, S. J. Transposon mutagenesis identifies uropathogenic *Escherichia coli* biofilm factors. **J Bacteriol**, v. 194, p. 6195-6205, 2012.

HAGAN, E. C.; LLOYD, A. L.; RASKO, D. A.; FAERBER, G. J.; MOBLEY, H. L. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. **PLoS Pathog**, v. 6, p. e1001187, 2010.

HAGAN, E. C.; MOBLEY, H. L. Haem acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection. **Mol Microbiol**, v. 71, p. 79-91, 2009.

HANNAN, T. J.; TOTSIKA, M.; MANSFIELD, K. J.; MOORE, K. H.; SCHEMBRI, M. A.; HULTGREN, S. J. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, p. 616-648, 2012.

HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Jpn J Infect Dis**, v. 60, p. 154-155, 2007.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HARRINGTON, S. M.; SHEIKH, J.; HENDERSON, I. R.; RUIZ-PEREZ, F.; COHEN, P. S.; NATARO, J. P. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infect Immun**, v. 77, p. 2465-2473, 2009.

HARRINGTON, S. M.; STRAUMAN, M. C.; ABE, C. M.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Cell Microbiol**, v. 7, p. 1565-1578, 2005.

HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annu Rev Microbiol**, v. 57, p. 249-273, 2003.

HEBBELSTRUP JENSEN, B.; OLSEN, K. E.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; PETERSEN, A. M. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, p. 614-630, 2014.

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, 1999a.

HENDERSON, I. R.; HICKS, S.; NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P.; PHILIPS, A. D.; NATARO, J. P. Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. **Infect Immun**, v. 67, p. 5338-5344, 1999b.

HERTZ, F. B.; NIELSEN, J. B.; SCHØNNING, K.; LITTAUER, P.; KNUDSEN, J. D.; LØBNER-OLESEN, A.; FRIMODT-MØLLER, N. Population structure of drug-susceptible,-resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract. **BMC Microbiol**, v. 16, p. 63, 2016.

HERZOG, K.; ENGELER DUSEL, J.; HUGENTOBLER, M.; BEUTIN, L.; SÄGESSER, G.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H.; NÜESCH-INDERBINEN, M. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. **Infection**, v. 42, p. 441-444, 2014.

HICKS, S.; CANDY, D. C.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. **Infect Immun**, v. 64, p. 4751-4760, 1996.

HUANG, D. B.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico. **Am J Trop Med Hyg**, v. 69, p. 506-508, 2003.

HUANG, D. B.; MOHAMED, J. A.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; OKHUUSEN, P. C. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. **J Med Microbiol**, v. 56, p. 1386-1392, 2007.

HUANG, D. B.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L.; KAMAT, P. P.; MHATRE, A. D.; OKHUUSEN, P. C.; CHIANG, T. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin Infect Dis**, v. 43, p. 556-563, 2006.

HUGHES, C.; PHILLIPS, R.; ROBERTS, A. P. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. **Infect Immun**, v. 35, p. 270-275, 1982.

HULL, R. A.; GILL, R. E.; HSU, P.; MINSHEW, B. H.; FALKOW, S. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from

a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. **Infect Immun**, v. 33, p. 933-938, 1981.

HULTGREN, S. J.; LINDBERG, F.; MAGNUSSON, G.; KIHLEBERG, J.; TENNENT, J. M.; NORMARK, S. The PapG adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* contains separate regions for receptor binding and for the incorporation into the pilus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, p. 4357-4361, 1989.

HUNG, C.; MARSCHALL, J.; BURNHAM, C. A.; BYUN, A. S.; HENDERSON, J. P. The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. **PLoS One**, v. 9, p. e86009, 2014.

HUNG, C. S.; DODSON, K. W.; HULTGREN, S. J. A murine model of urinary tract infection. **Nat Protoc**, v. 4, p. 1230-1243, 2009.

HVIDBERG, H.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; CHRISTENSEN, N.; RASMUSSEN, S. N.; FRIMODT-MØLLER, N. Development of a long-term ascending urinary tract infection mouse model for antibiotic treatment studies. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 156-163, 2000.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H. K.; SONG, Z. J.; MOSER, C.; JENSEN, P. Ø.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilms. **Int J Oral Sci**, v. 3, p. 55-65, 2011.

IKUMAPAYI, U. N.; BOISEN, N.; HOSSAIN, M. J.; BETTS, M.; LAMIN, M.; SAHA, D.; KWAMBANA-ADAMS, B.; DIONE, M.; ADEGBOLA, R. A.; ROCA, A.; NATARO, J. P.; ANTONIO, M. Identification of subsets of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with diarrheal disease among under 5 years of age children from rural Gambia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, p. 997-1004, 2017.

ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; EZAKI, T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J Clin Microbiol**, v. 35, p. 2546-2550, 1997.

JENKINS, C.; CHART, H.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; TOMPKINS, D. S. Association of putative pathogenicity genes with adherence characteristics and fimbrial genotypes in typical enteroaggregative *Escherichia coli* from patients with and without diarrhoea in the United Kingdom. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 26, p. 901-906, 2007.

JOENSEN, K. G.; TETZSCHNER, A. M.; IGUCHI, A.; AARESTRUP, F. M.; SCHEUTZ, F. Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. **J Clin Microbiol**, v. 53, p. 2410-2426, 2015.

JOHNSEN, N.; HAMILTON, A.; GREVE, A. S.; CHRISTENSEN, M. G.; THERKILDSEN, J. R.; WEHMÖLLER, J.; SKALS, M.; PRAETORIUS, H. A. α -Haemolysin production, as a single factor, causes fulminant sepsis in a model of *Escherichia coli*-induced bacteraemia. **Cell Microbiol**, v. 21, p. e13017, 2019.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; GAJEWSKI, A.; SOTO, S.; HORCAJADA, J. P.; JIMENEZ DE ANTA, M. T.; VILA, J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. **J Infect Dis**, v. 191, p. 46-50, 2005.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; OWENS, K.; GAJEWSKI, A.; WINOKUR, P. L. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. **J Infect Dis**, v. 188, p. 759-768, 2003.

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.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J Infect Dis**, v. 181, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 4, p. 80-128, 1991.

JUSTICE, S. S.; HUNG, C.; THERIOT, J. A.; FLETCHER, D. A.; ANDERSON, G. G.; FOOTER, M. J.; HULTGREN, S. J. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 1333-1338, 2004.

JØNSSON, R.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; MATEIU, R. V.; SANTIAGO, A. E.; JENSSEN, H.; NATARO, J. P.; KROGFELT, K. A. Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 83, p. 1396-1405, 2015.

KAI-LARSEN, Y.; LÜTHJE, P.; CHROMEK, M.; PETERS, V.; WANG, X.; HOLM, A.; KÁDAS, L.; HEDLUND, K. O.; JOHANSSON, J.; CHAPMAN, M. R.; JACOBSON, S. H.; RÖMLING, U.; AGERBERTH, B.; BRAUNER, A. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. **PLoS Pathog**, v. 6, p. e1001010, 2010.

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

KHAIRY, R. M.; MOHAMED, E. S.; ABDEL GHANY, H. M.; ABDELRAHIM, S. S. Phylogenetic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. **PLoS One**, v. 14, p. e0222441, 2019.

KHAN, A. S.; KNIEP, B.; OELSCHLAEGGER, T. A.; VAN DIE, I.; KORHONEN, T.; HACKER, J. Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 68, p. 3541-3547, 2000.

KONIGSBERG, W. H.; HENDERSON, L. Amino acid sequence of the catalytic subunit of aspartate transcarbamoylase from *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, p. 2467-2471, 1983.

KORHONEN, T. K.; PARKKINEN, J.; HACKER, J.; FINNE, J.; PERE, A.; RHEN, M.; HOLTHÖFER, H. Binding of *Escherichia coli* S fimbriae to human kidney epithelium. **Infect Immun**, v. 54, p. 322-327, 1986.

KOT, B. Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*. **Pol J Microbiol**, v. 68, p. 403-415, 2019.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A. S.; ZAIDI, A. K.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J. B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R. A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C. E.; MINTZ, E. D.; BERKELEY, L. Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R. M.; LEVINE, M. M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, p. 209-222, 2013.

KREFT, B.; PLACZEK, M.; DOEHN, C.; HACKER, J.; SCHMIDT, G.; WASENAUER, G.; DAHA, M. R.; VAN DER WOUDE, F. J.; SACK, K. S fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* bind to primary human renal proximal tubular epithelial cells but do not induce expression of intercellular adhesion molecule 1. **Infect Immun**, v. 63, p. 3235-3238, 1995.

KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the *FimH* protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infect Immun**, v. 58, p. 1995-1998, 1990.

KUDINHA, T.; JOHNSON, J. R.; ANDREW, S. D.; KONG, F.; ANDERSON, P.; GILBERT, G. L. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. **Pediatr Infect Dis J**, v. 32, p. 543-548, 2013.

KÄLLENIUS, G.; MÖLLBY, R.; SVENSON, S. B.; WINBERG, J.; HULTBERG, H. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection**, v. 8 Suppl 3, p. 288-293, 1980.

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

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

LANG, C.; FRUTH, A.; HOLLAND, G.; LAUE, M.; MÜHLEN, S.; DERSCH, P.; FLIEGER, A. Novel type of pilus associated with a Shiga-toxigenic *E. coli* hybrid pathovar conveys aggregative adherence and bacterial virulence. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, p. 203, 2018.

LARA, F. B.; NERY, D. R.; DE OLIVEIRA, P. M.; ARAUJO, M. L.; CARVALHO, F. R.; MESSIAS-SILVA, L. C.; 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. 146, 2017.

LARSEN, M. V.; COSENTINO, S.; RASMUSSEN, S.; FRIIS, C.; HASMAN, H.; MARVIG, R. L.; JELSBAK, L.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; USSERY, D. W.; AARESTRUP, F. M.; LUND, O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **J Clin Microbiol**, v. 50, p. 1355-1361, 2012.

LASCOWSKI, K. M.; GUTH, B. E.; MARTINS, F. H.; ROCHA, S. P.; IRINO, K.; PELAYO, J. S. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. **J Appl Microbiol**, v. 114, p. 1230-1239, 2013.

LE BOUGUÉNEC, C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. **Int J Med Microbiol**, v. 295, p. 471-478, 2005.

LEIMBACH, A. **Bac-genomics-scripts: bovine *E. coli* mastitis comparative genomics edition**. In: Zenodo. CERN Data Centre and Invenio. 2016a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.215824>. Acesso em: 15 de jan. 2020.

LEIMBACH, A. **ecoli_VF_Collection**. In: Zenodo. CERN Data Centre and Invenio. 2016b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.56686>. Acesso em: 16 de jan. 2020.

LEIMBACH, A.; POEHLEIN, A.; VOLLMERS, J.; GÖRLICH, D.; DANIEL, R.; DOBRINDT, U. No evidence for a bovine mastitis *Escherichia coli* pathotype. **BMC Genomics**, v. 18, p. 359, 2017.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Res**, v. 47, p. W256-W259, 2019.

LEVINE, M. M.; BERGQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 1, p. 1119-1122, 1978.

LEWIS, A. J.; RICHARDS, A. C.; MULVEY, M. A. Invasion of host cells and tissues by uropathogenic bacteria. **Microbiol Spectr**, v. 4, 2016.

LI, J.; WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. **PLoS One**, v. 6, p. e21804, 2011.

LIM, J. Y.; PINKNER, J. S.; CEGELSKI, L. Community behavior and amyloid-associated phenotypes among a panel of uropathogenic *E. coli*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 443, p. 345-350, 2014.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr Suppl**, v. 381, p. 39-44, 1992.

LIMA, A. A. M.; SOARES, A. M.; FILHO, J.; HAVT, A.; LIMA, I.; LIMA, N. L.; ABREU, C. B.; JUNIOR, F. S.; MOTA, R.; PAN, W. K.; TROEGER, C.; MEDEIROS, P.; VERAS, H. N.; PRATA, M. A.; MCCORMICK, B.; MCGRATH, M.; ROGAWSKI, E. T.; HOUP, E. R.; PLATTS-MILLS, J. A.; GRATZ, J.; SAMIE, A.; BESSONG, P.; BABJI, S.; KANG, G.; QURESHI, S.; SHAKOOR, S.; BHUTTA, Z. A.; HAQUE, R.; AHMED, T.; MDUMA, E. R.; SVENSEN, E.; KOSEK, M.; YORI, P. P.; BODHIDATTA, L.; JASMIN, S.; MASON, C. J.; LANG, D.; GOTTLIEB, M.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical infection and coinfections and impaired child growth in the MAL-ED cohort study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 66, p. 325-333, 2018.

LIMA, I. F. N.; BOISEN, N.; SILVA, J.; HAVT, A.; DE CARVALHO, E. B.; SOARES, A. M.; LIMA, N. L.; MOTA, R.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **J Med Microbiol**, v. 62, p. 683-693, 2013.

LIU, X.; LIU, H.; WANG, L.; PENG, Q.; LI, Y.; ZHOU, H.; LI, Q. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from swine in Northwest China. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1756, 2018.

LOPES, A. M. **Prevalência de *Escherichia coli* diarreio gênica em crianças com diarreia no norte do estado do Paraná**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2015.

LOZER, D. M.; SOUZA, T. B.; MONFARDINI, M. V.; VICENTINI, F.; KITAGAWA, S. S.; SCALETSKY, I. C.; SPANO, L. C. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 418, 2013.

LUCK, S. N.; BENNETT-WOOD, V.; POON, R.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 73, p. 3063-3071, 2005.

LUDWIG, A.; BAUER, S.; BENZ, R.; BERGMANN, B.; GOEBEL, W. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. **Mol Microbiol**, v. 31, p. 557-567, 1999.

LÓPEZ-BANDA, D. A.; CARRILLO-CASAS, E. M.; LEYVA-LEYVA, M.; OROZCO-HOYUELA, G.; MANJARREZ-HERNÁNDEZ, Á. H.; ARROYO-ESCALANTE, S.; MONCADA-BARRÓN, D.; VILLANUEVA-RECILLAS, S.; XICOHTENCATL-CORTES, J.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R. Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 959206, 2014.

LÜTHJE, P.; BRAUNER, A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. **Adv Microb Physiol**, v. 65, p. 337-372, 2014.

MANDOMANDO, I.; VUBIL, D.; BOISEN, N.; QUINTÓ, L.; 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. e0008274, 2020.

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

MARTINEZ, J. J.; MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO J**, v. 19, p. 2803-2812, 2000.

MARTINS, F. H.; GUTH, B. E.; PIAZZA, R. M.; ELIAS, W. P.; LEÃO, S. C.; MARZOA, J.; DAHBI, G.; MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; PELAYO, J. S. Lambs are an important source of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. **Vet Microbiol**, v. 196, p. 72-77, 2016.

MARTINS, F. H.; GUTH, B. E.; PIAZZA, R. M.; LEÃO, S. C.; LUDOVICO, A.; LUDOVICO, M. S.; DAHBI, G.; MARZOA, J.; MORA, A.; BLANCO, J.; PELAYO, J. S. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. **Vet Microbiol**, v. 175, p. 150-156, 2015.

MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DUPONT, H. L.; SATTERWHITE, T. K.; WINSOR, D. K. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. **J Infect Dis**, v. 154, p. 524-527, 1986.

MCCORMICK, B. A.; FRANKLIN, D. P.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S. Type 1 pili are not necessary for colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by type 1-piliated *Escherichia coli* F-18 and *E. coli* K-12. **Infect Immun**, v. 57, p. 3022-3029, 1989.

MEADOR, J. P.; CALDWELL, M. E.; COHEN, P. S.; CONWAY, T. *Escherichia coli* pathotypes occupy distinct niches in the mouse intestine. **Infect Immun**, v. 82, p. 1931-1938, 2014.

MEDINA, A. M.; RIVERA, F. P.; ROMERO, L. M.; KOLEVIC, L. A.; CASTILLO, M. E.; VERNE, E.; HERNANDEZ, R.; MAYOR, Y. E.; BARLETTA, F.; MERCADO, E.; OCHOA, T. J. Diarrheagenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus (HIV) pediatric patients in Lima, Peru. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, p. 158-163, 2010.

MELICAN, K.; SANDOVAL, R. M.; KADER, A.; JOSEFSSON, L.; TANNER, G. A.; MOLITORIS, B. A.; RICHTER-DAHLFORS, A. Uropathogenic *Escherichia coli* P and Type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. **PLoS Pathog**, v. 7, p. e1001298, 2011.

MÉNARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, p. 43-60, 2002.

MICENKOVÁ, L.; ŠTAUDOVÁ, B.; BOSÁK, J.; MIKALOVÁ, L.; LITTNEROVÁ, S.; VRBA, M.; ŠEVČÍKOVÁ, A.; WOZNICOVÁ, V.; ŠMAJS, D. Bacteriocin-encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal *Escherichia coli* strains. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 109, 2014.

MIRELES, J. R.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R. M. *Salmonella* enterica serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **J Bacteriol**, v. 183, p. 5848-5854, 2001.

MOHAMMADZADEH, M.; TAVAKOLI, M.; YASLIANIFARD, S.; ASADI, E.; GOLMOHAMMADI, R.; MIRNEJAD, R. Genetic diversity and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from kidney transplant recipients. **Infect Drug Resist**, v. 12, p. 1795-1803, 2019.

MOHSIN, J.; PÁL, T.; PETERSEN, J. E.; DARWISH, D.; GHAZAWI, A.; ASHRAF, T.; SONNEVEND, A. Plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in an *Escherichia coli* ST10 bloodstream isolate in the sultanate of Oman. **Microb Drug Resist**, v. 24, p. 278-282, 2018.

MONFARDINI, M. V. **Estudo da adesão de *Escherichia coli* enteroagregativa atípica a superfícies biótica e abiótica.** Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia) - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2018.

MONTEIRO, B. T.; CAMPOS, L. C.; SIRCILI, M. P.; FRANZOLIN, M. R.; BEVILACQUA, L. F.; NATARO, J. P.; ELIAS, W. P. The dispersin-encoding gene (*aap*) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, p. 81-84, 2009.

MOON, J. Y.; PARK, J. H.; KIM, Y. B. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 253, p. 215-220, 2005.

MORAES, C. T. P.; LONGO, J.; SILVA, L. B.; PIMENTA, D. C.; CARVALHO, E.; MORONE, M.; DA RÓS, N.; SERRANO, S.; SANTOS, A.; PIAZZA, R.; BARBOSA, A. S.; ELIAS, W. P. Surface protein dispersin of enteroaggregative *Escherichia coli*

binds plasminogen that is converted into active plasmin. **Front Microbiol**, v. 11, p. 1222, 2020.

MOREIRA, C. G.; CARNEIRO, S. M.; NATARO, J. P.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 226, p. 79-85, 2003.

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

MOUCHLI, M.; SHAKHATREH, M.; YEATON, P. Unexpected Cause of Abdominal Pain and Genitourinary Symptoms. **Gastroenterology**, v. 157, p. e10-e12, 2019.

MUNERA, D.; RITCHIE, J. M.; HATZIOS, S. K.; BRONSON, R.; FANG, G.; SCHADT, E. E.; DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. **Nat Commun**, v. 5, p. 3080, 2014.

MURASE, K.; OOKA, T.; IGUCHI, A.; OGURA, Y.; NAKAYAMA, K.; ASADULGHANI, M.; ISLAM, M. R.; HIYOSHI, H.; KODAMA, T.; BEUTIN, L.; HAYASHI, T. Haemolysin E- and enterohaemolysin-derived haemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. **Microbiology (Reading)**, v. 158, p. 746-758, 2012.

MYSOREKAR, I. U.; HULTGREN, S. J. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 14170-14175, 2006.

NASCIMENTO, J. A. S.; SANTOS, F. F.; VALIATTI, T. B.; SANTOS-NETO, J. F.; M SANTOS, A. C.; CAYÔ, R.; GALES, A. C.; GOMES, T. A. T. Frequency and diversity of hybrid *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. **Microorganisms**, v. 9, p. 693, 2021.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J Infect Dis**, v. 171, p. 465-468, 1995.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; MANEVAL, D. R.; GERMAN, A. L.; MARTIN, W. C.; LEVINE, M. M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect Immun**, v. 60, p. 2297-2304, 1992.

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

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr Infect Dis J**, v. 6, p. 829-831, 1987.

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

NAVARRO-GARCÍA, F.; CANIZALEZ-ROMAN, A.; BURLINGAME, K. E.; TETER, K.; VIDAL, J. E. Pet, a non-AB toxin, is transported and translocated into epithelial cells by a retrograde trafficking pathway. **Infect Immun**, v. 75, p. 2101-2109, 2007a.

NAVARRO-GARCÍA, F.; CANIZALEZ-ROMAN, A.; LUNA, J.; SEARS, C.; NATARO, J. P. Plasmid-encoded toxin of enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells. **Infect Immun**, v. 69, p. 1053-1060, 2001.

NAVARRO-GARCÍA, F.; CANIZALEZ-ROMAN, A.; VIDAL, J. E.; SALAZAR, M. I. Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. **Microbiology (Reading)**, v. 153, p. 2828-2838, 2007b.

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

NAVARRO-GARCÍA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin. **Future Microbiol**, v. 5, p. 1005-1013, 2010.

NAVARRO-GARCÍA, F. *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. **Microbiol Spectr**, v. 2, 2014.

NAVARRO-GARCÍA, F.; ESLAVA, C.; VILLASECA, J. M.; LÓPEZ-REVILLA, R.; CZECZULIN, J. R.; SRINIVAS, S.; NATARO, J. P.; CRAVIOTO, A. *In vitro* effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 66, p. 3149-3154, 1998.

NAVARRO-GARCÍA, F.; GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; GARCIA-TOVAR, C.; CASTRO, L. A.; SALAZAR-GONZALEZ, H.; CORDOVA, V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. **Infect Immun**, v. 78, p. 4101-4109, 2010.

NAVARRO-GARCÍA, F.; SEARS, C.; ESLAVA, C.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 67, p. 2184-2192, 1999.

NAZEMI, A.; MIRINARGASI, M.; MERIKHI, N.; SHARIFI, S. H. Distribution of pathogenic genes *aatA*, *aap*, *aggR*, among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and their linkage with StbA gene. **Indian J Microbiol**, v. 51, p. 355-358, 2011.

NISHI, J.; SHEIKH, J.; MIZUGUCHI, K.; LUISI, B.; BURLAND, V.; BOUTIN, A.; ROSE, D. J.; BLATTNER, F. R.; NATARO, J. P. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J Biol Chem**, v. 278, p. 45680-45689, 2003.

NORINDER, B. S.; KÖVES, B.; YADAV, M.; BRAUNER, A.; SVANBORG, C. Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire? **Microb Pathog**, v. 52, p. 10-16, 2012.

NOWICKI, B.; HART, A.; COYNE, K. E.; LUBLIN, D. M.; NOWICKI, S. Short consensus repeat-3 domain of recombinant decay-accelerating factor is recognized by *Escherichia coli* recombinant Dr adhesin in a model of a cell-cell interaction. **J Exp Med**, v. 178, p. 2115-2121, 1993.

NOWICKI, B.; LABIGNE, A.; MOSELEY, S.; HULL, R.; HULL, S.; MOULDS, J. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect Immun**, v. 58, p. 279-281, 1990.

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

O'BRIEN, C. L.; BRINGER, M. A.; HOLT, K. E.; GORDON, D. M.; DUBOIS, A. L.; BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; PAVLI, P. Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. **Gut**, v. 66, p. 1382-1389, 2017.

OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, p. 198-201, 1984.

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

OKHUUSEN, P. C.; JIANG, Z. D.; CARLIN, L.; FORBES, C.; DUPONT, H. L. Post-diarrhea chronic intestinal symptoms and irritable bowel syndrome in North American travelers to Mexico. **Am J Gastroenterol**, v. 99, p. 1774-1778, 2004.

OLD, D. C. Inhibition of the interaction between fimbrial haemagglutinins and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates. **J Gen Microbiol**, v. 71, p. 149-157, 1972.

OLESEN, B.; KOLMOS, H. J.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Cluster of multiresistant *Escherichia coli* O78:H10 in greater Copenhagen. **Scand J Infect Dis**, v. 26, p. 406-410, 1994.

OLESEN, B.; SCHEUTZ, F.; ANDERSEN, R. L.; MENARD, M.; BOISEN, N.; JOHNSTON, B.; HANSEN, D. S.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P.; JOHNSON, J. R. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. **J Clin Microbiol**, v. 50, p. 3703-3711, 2012.

OLSÉN, A.; ARNQVIST, A.; HAMMAR, M.; SUKUPOLVI, S.; NORMARK, S. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the

subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 7, p. 523-536, 1993.

OPINTAN, J. A.; NEWMAN, M. J.; AYEK-KUMI, P. F.; AFFRIM, R.; GEPI-ATTEE, R.; SEVILLEJA, J. E.; ROCHE, J. K.; NATARO, J. P.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. L. Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, p. 936-943, 2010.

ORNDORFF, P. E.; BLOCH, C. A. The role of type 1 pili in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections: a short review and some new ideas. **Microb Pathog**, v. 9, p. 75-79, 1990.

OTT, M.; HOSCHÜTZKY, H.; JANN, K.; VAN DIE, I.; HACKER, J. Gene clusters for S fimbrial adhesin (*sfa*) and F1C fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function. **J Bacteriol**, v. 170, p. 3983-3990, 1988.

OWRANGI, B.; MASTERS, N.; KUBALLA, A.; O'DEA, C.; VOLLMERHAUSEN, T. L.; KATOULI, M. Invasion and translocation of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urosepsis and patients with community-acquired urinary tract infection. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 37, p. 833-839, 2018.

PAIXÃO, A. C.; FERREIRA, A. C.; FONTES, M.; THEMUDO, P.; ALBUQUERQUE, T.; SOARES, M. C.; FEVEREIRO, M.; MARTINS, L.; DE SÁ, M. Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. **Poult Sci**, v. 95, p. 1646-1652, 2016.

PARDUCCI, R. E.; CABRERA, R.; BAEZ, M.; GUIXÉ, V. Evidence for a catalytic Mg²⁺ ion and effect of phosphate on the activity of *Escherichia coli* phosphofructokinase-2: regulatory properties of a ribokinase family member. **Biochemistry**, v. 45, p. 9291-9299, 2006.

PARK, H. K.; JUNG, Y. J.; CHAE, H. C.; SHIN, Y. J.; WOO, S. Y.; PARK, H. S.; LEE, S. J. Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (*kps*, *usp* and *ireA*) and enteroaggregative genes (*aggR* and *aap*) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. **Scand J Urol Nephrol**, v. 43, p. 51-57, 2009.

PARKKINEN, J.; ROGERS, G. N.; KORHONEN, T.; DAHR, W.; FINNE, J. Identification of the O-linked sialyloligosaccharides of glycophorin A as the erythrocyte receptors for S-fimbriated *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 54, p. 37-42, 1986.

PASCHKE, C.; APELT, N.; FLEISCHMANN, E.; PERONA, P.; VALENTINY, C.; LÖSCHER, T.; HERBINGER, K. H. Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, p. 1194-1200, 2011.

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.

PICK, A.; RÜHMANN, B.; SCHMID, J.; SIEBER, V. Novel CAD-like enzymes from *Escherichia coli* K-12 as additional tools in chemical production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 5815-5824, 2013.

PUGSLEY, A. P.; OUDEGA, B. Methods for studying colicins and their plasmids. In: HARDY K. G. **Plasmids: A Practical Approach**. Hardy, K. G.; Oxford: IRL Press. 1987. pp. 105–161.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, 2002.

RAMOS, N. L.; DZUNG, D. T.; STOPSACK, K.; JANKÓ, V.; POURSHAFIE, M. R.; KATOULI, M.; BRAUNER, A. Characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* from children with urinary tract infection in different countries. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, p. 1587-1593, 2011.

RASKO, D. A.; ROSOVITZ, M. J.; MYERS, G. S.; MONGODIN, E. F.; FRICKE, W. F.; GAJER, P.; CRABTREE, J.; SEBAIHIA, M.; THOMSON, N. R.; CHAUDHURI, R.; HENDERSON, I. R.; SPERANDIO, V.; RAVEL, J. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. **J Bacteriol**, v. 190, p. 6881-6893, 2008.

RICHTER, A. M.; POVOLOTSKY, T. L.; WIELER, L. H.; HENGGE, R. Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. **EMBO Mol Med**, v. 6, p. 1622-1637, 2014.

RILEY, M. A.; GORDON, D. M. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. **J Gen Microbiol**, v. 138, p. 1345-1352, 1992.

RIVEROS, M.; GARCÍA, W.; GARCÍA, C.; DURAND, D.; MERCADO, E.; RUIZ, J.; OCHOA, T. J. Molecular and phenotypic characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from bacteremic children. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, p. 1329-1336, 2017.

ROBINSON, A. E.; HEFFERNAN, J. R.; HENDERSON, J. P. The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. **Future Microbiol**, v. 13, p. 745-756, 2018.

ROYAN, S. V.; JONES, R. M.; KOUTSOURIS, A.; ROXAS, J. L.; FALZARI, K.; WEFLEN, A. W.; KIM, A.; BELLMEYER, A.; TURNER, J. R.; NEISH, A. S.; RHEE, K. J.; VISWANATHAN, V. K.; HECHT, G. A. Enteropathogenic *E. coli* non-LEE encoded effectors NleH1 and NleH2 attenuate NF- κ B activation. **Mol Microbiol**, v. 78, p. 1232-1245, 2010.

RUIZ, R. C.; MELO, K. C.; ROSSATO, S. S.; BARBOSA, C. M.; CORRÊA, L. M.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* secretes plasmid encoded toxin. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 896235, 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 U S A**, v. 108, p. 12881-12886, 2011.

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.

RÖMLING, U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, p. 1234-1246, 2005.

RÖMLING, U.; BOKRANZ, W.; RABSCH, W.; ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; TSCHÄPE, H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. **Int J Med Microbiol**, v. 293, p. 273-285, 2003.

RÖMLING, U.; SIERRALTA, W. D.; ERIKSSON, K.; NORMARK, S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. **Mol Microbiol**, v. 28, p. 249-264, 1998.

RÜTTLER, M. E.; YANZÓN, C. S.; CUITIÑO, M. J.; RENNA, N. F.; PIZARRO, M. A.; ORTIZ, A. M. Evaluation of a multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocell**, v. 30, p. 301-308, 2006.

SALDAÑA, Z.; DE LA CRUZ, M. A.; CARRILLO-CASAS, E. M.; DURÁN, L.; ZHANG, Y.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; PUENTE, J. L.; DAAKA, Y.; GIRÓN, J. A. Production of the *Escherichia coli* common pilus by uropathogenic *E. coli* is associated with adherence to HeLa and HTB-4 cells and invasion of mouse bladder urothelium. **PLoS One**, v. 9, p. e101200, 2014.

SALVADOR, F. A. **Identificação de novos genes potencialmente envolvidos em aderência em amostras de *Escherichia coli* uropatogênica**. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia) - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SAMPAIO, S. C.; GOMES, T. A. T.; PICHON, C.; DU MERLE, L.; GUADAGNINI, S.; ABE, C. M.; SAMPAIO, J. L.; LE BOUGUÉNEC, C. The flagella of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain are required for efficient interaction with and stimulation of interleukin-8 production by enterocytes *in vitro*. **Infect Immun**, v. 77, p. 4406-4413, 2009.

SANCHEZ-VILLAMIL, J.; NAVARRO-GARCIA, F. Role of virulence factors on host inflammatory response induced by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **Future Microbiol**, v. 10, p. 1009-1033, 2015.

SANTOS, A. C.; ZIDKO, A. C.; 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.

SANTOS, A. C. 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. 339, 2020.

SARABI ASIABAR, A.; ASADZADEH AGHDAEI, H.; SABOKBAR, A.; ZALI, M. R.; FEIZABADI, M. M. Investigation of adherent-invasive *E. coli* in patients with Crohn's disease. **Med J Islam Repub Iran**, v. 32, p. 11, 2018.

SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J. P.; SHEIKH, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K.; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 133-139, 2004.

SARKAR, S.; HUTTON, M. L.; VAGENAS, D.; RUTER, R.; SCHÜLLER, S.; LYRAS, D.; SCHEMBRI, M. A.; TOTSIKA, M. Intestinal colonization traits of pandemic multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131. **J Infect Dis**, v. 218, p. 979-990, 2018.

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. 10, 2019.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D. C.; LEVINE, M. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. **J Clin Invest**, v. 87, p. 1450-1455, 1991.

SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; CRAVIOTO, A.; MOLINA, J.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M.; FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J Infect Dis**, v. 173, p. 1019-1022, 1996.

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

SCAVIA, G.; STAFFOLANI, M.; FISICHELLA, S.; STRIANO, G.; COLLETTA, S.; FERRI, G.; ESCHER, M.; MINELLI, F.; CAPRIOLI, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **J Med Microbiol**, v. 57, p. 1141-1146, 2008.

SCHEMBRI, M. A.; BLOM, J.; KROGFELT, K. A.; KLEMM, P. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 73, p. 4626-4633, 2005.

SCHEUTZ, F.; NIELSEN, E. M.; FRIMODT-MØLLER, J.; BOISEN, N.; MORABITO, S.; TOZZOLI, R.; NATARO, J. P.; CAPRIOLI, A. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. **Euro Surveill**, v. 16, 2011.

SCHIEBEL, J.; BÖHM, A.; NITSCHKE, J.; BURDUKIEWICZ, M.; WEINREICH, J.; ALI, A.; ROGGENBUCK, D.; RÖDIGER, S.; SCHIERACK, P. Genotypic and phenotypic characteristics associated with biofilm formation by human clinical *Escherichia coli* isolates of different pathotypes. **Appl Environ Microbiol**, v. 83, 2017.

SCHILLING, J. D.; MULVEY, M. A.; HULTGREN, S. J. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. **J Infect Dis**, v. 183 Suppl 1, p. S36-40, 2001.

SCHMOLL, T.; MORSCHHÄUSER, J.; OTT, M.; LUDWIG, B.; VAN DIE, I.; HACKER, J. Complete genetic organization and functional aspects of the *Escherichia coli* S fimbrial adhesion determinant: nucleotide sequence of the genes *sfa* B, C, D, E, F. **Microb Pathog**, v. 9, p. 331-343, 1990.

SCHUROFF, P. A.; BUGOS, T. N.; LIMA, N. R.; LOPES, A. M.; PELAYO, J. S. Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*, potencialmente patogênicas oriundas de estação de tratamento de água. **Arq Ciênc Saúde**, v. 21, p. 93-98, 2014.

SCHUROFF, P. A. **Identificação e caracterização de *Escherichia coli* enteroagregativa em amostras de água destinadas ao consumo humano na região Norte do estado do Paraná**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2016.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2068-2069, 2014.

SELANDER, R. K.; LEVIN, B. R. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. **Science**, v. 210, p. 545-547, 1980.

SHAH, C.; BARAL, R.; BARTAULA, B.; SHRESTHA, L. B. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiol**, v. 19, p. 204, 2019.

SHAMIR, E. R.; WARTHAN, M.; BROWN, S. P.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; HOFFMAN, P. S. Nitazoxanide inhibits biofilm production and hemagglutination by enteroaggregative *Escherichia coli* strains by blocking assembly of AafA fimbriae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p. 1526-1533, 2010.

SHEIKH, J.; CZECZULIN, J. R.; HARRINGTON, S.; HICKS, S.; HENDERSON, I. R.; LE BOUGUÉNEC, C.; GOUNON, P.; PHILLIPS, A.; NATARO, J. P. A novel dispersin

protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, v. 110, p. 1329-1337, 2002.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL'AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 41, p. 983-997, 2001.

SHELDON, I. M.; RYCROFT, A. N.; DOGAN, B.; CRAVEN, M.; BROMFIELD, J. J.; CHANDLER, A.; ROBERTS, M. H.; PRICE, S. B.; GILBERT, R. O.; SIMPSON, K. W. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. **PLoS One**, v. 5, p. e9192, 2010.

SHPIGEL, N. Y.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, p. 60-65, 2008.

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

SIMON, R.; PRIEFER, 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.

SMAJS, D.; MICENKOVÁ, L.; SMARDA, J.; VRBA, M.; SEVČÍKOVÁ, A.; VALIŠOVÁ, Z.; WOZNICOVÁ, V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 288, 2010.

SMARDA, J.; OBDRZÁLEK, V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. **J Basic Microbiol**, v. 41, p. 367-374, 2001.

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

SNYDER, J. A.; HAUGEN, B. J.; BUCKLES, E. L.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; DONNENBERG, M. S.; WELCH, R. A.; MOBLEY, H. L. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. **Infect Immun**, v. 72, p. 6373-6381, 2004.

SPANO, L. C.; DA CUNHA, K. F.; MONFARDINI, M. V.; DE CÁSSIA BERGAMASCHI FONSECA, R.; SCALETSKY, I. C. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. **BMC Infect Dis**, v. 17, p. 773, 2017.

SPAULDING, C. N.; KLEIN, R. D.; RUER, S.; KAU, A. L.; SCHREIBER, H. L.; CUSUMANO, Z. T.; DODSON, K. W.; PINKNER, J. S.; FREMONT, D. H.; JANETKA, J. W.; REMAUT, H.; GORDON, J. I.; HULTGREN, S. J. Selective depletion of

uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist. **Nature**, v. 546, p. 528-532, 2017.

SPURBECK, R. R.; DINH, P. C.; JR, WALK, S. T.; STAPLETON, A. E.; HOOTON, T. M.; NOLAN, L. K.; KIM, K. S.; JOHNSON, J. R.; MOBLEY, H. L. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. **Infect Immun**, v. 80, p. 4115-4122, 2012.

STAHLHUT, S. G.; CHATTOPADHYAY, S.; STRUVE, C.; WEISSMAN, S. J.; APRIKIAN, P.; LIBBY, S. J.; FANG, F. C.; KROGFELT, K. A.; SOKURENKO, E. V. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **J Bacteriol**, v. 191, p. 1941-1950, 2009.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1312-1313, 2014.

STEINER, T. S.; NATARO, J. P.; POTEET-SMITH, C. E.; SMITH, J. A.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J Clin Invest**, v. 105, p. 1769-1777, 2000.

STEINER, T. S.; LIMA, A. A.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J Infect Dis**, v. 177, p. 88-96, 1998.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; CIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891-899, 2007.

STORK, C.; KOVÁCS, B.; RÓZSAI, B.; PUTZE, J.; KIEL, M.; DORN, Á.; KOVÁCS, J.; MELEGH, S.; LEIMBACH, A.; KOVÁCS, T.; SCHNEIDER, G.; KERÉNYI, M.; EMÖDY, L.; DOBRINDT, U. Characterization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* isolates in search of alternative strains for efficient bacterial interference against uropathogens. **Front Microbiol**, v. 9, p. 214, 2018.

STÆRK, K.; KHANDIGE, S.; KOLMOS, H. J.; MØLLER-JENSEN, J.; ANDERSEN, T. E. Uropathogenic *Escherichia coli* express type 1 fimbriae only in surface adherent populations under physiological growth conditions. **J Infect Dis**, v. 213, p. 386-394, 2016.

SUTRINA, S. L.; DANIEL, K.; LEWIS, M.; CHARLES, N. T.; ANSELM, C. K.; THOMAS, N.; HOLDER, N. Biofilm growth of *Escherichia coli* is subject to cAMP-dependent and cAMP-independent inhibition. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 25, p. 209-225, 2015.

SWANSON, T. N.; BILGE, S. S.; NOWICKI, B.; MOSELEY, S. L. Molecular structure of the Dr adhesin: nucleotide sequence and mapping of receptor-binding domain by use of fusion constructs. **Infect Immun**, v. 59, p. 261-268, 1991.

TAGLICHT, D.; PADAN, E.; SCHULDINER, S. Overproduction and purification of a functional Na⁺/H⁺ antiporter coded by *nhaA* (ant) from *Escherichia coli*. **J Biol Chem**, v. 266, p. 11289-11294, 1991.

TERLIZZI, M. E.; GRIBAUDO, G.; MAFFEI, M. E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1566, 2017.

TOBE, T.; HAYASHI, T.; HAN, C. G.; SCHOOLNIK, G. K.; OHTSUBO, E.; SASAKAWA, C. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. **Infect Immun**, v. 67, p. 5455-5462, 1999.

TOKUDA, K.; NISHI, J.; IMUTA, N.; FUJIYAMA, R.; KAMENOSONO, A.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiol Immunol**, v. 54, p. 320-329, 2010.

TOVAL, F.; KÖHLER, C. D.; VOGEL, U.; WAGENLEHNER, F.; MELLMANN, A.; FRUTH, A.; SCHMIDT, M. A.; KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; DOBRINDT, U. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 407-418, 2014.

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

TRAUTNER, B. W.; HULL, R. A.; DAROUICHE, R. O. Colicins prevent colonization of urinary catheters. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 413-415, 2005.

TSENG, C. C.; LIN, W. H.; WU, A. B.; WANG, M. C.; TENG, C. H.; WU, J. J. *Escherichia coli* FimH adhesins act synergistically with PapGII adhesins for enhancing establishment and maintenance of kidney infection. **J Microbiol Immunol Infect**, 2020. *Ahead of print*.

VALENSKI, M. L.; HARRIS, S. L.; SPEARS, P. A.; HORTON, J. R.; ORNDORFF, P. E. The Product of the *fimI* gene is necessary for *Escherichia coli* type 1 pilus biosynthesis. **J Bacteriol**, v. 185, p. 5007-5011, 2003.

VALIATTI, T. B.; SANTOS, F. F.; SANTOS, A.; NASCIMENTO, J.; SILVA, R. M.; CARVALHO, E.; SINIGAGLIA, R.; GOMES, T. A. T. Genetic and virulence characteristics of a hybrid atypical enteropathogenic and uropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC/UPEC) strain. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, p. 492, 2020.

VIEIRA, M. A.; DIAS, R.; DOS SANTOS, L. F.; RALL, V.; GOMES, T. A. T.; HERNANDES, R. T. Diversity of strategies used by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to induce attaching and effacing lesion in epithelial cells. **J Med Microbiol**, v. 68, p. 940-951, 2019.

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-BAÑO, 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.; VARGAS, M.; HENDERSON, I. R.; GASCÓN, J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. **J Infect Dis**, v. 182, p. 1780-1783, 2000.

VILHENA-COSTA, A. B.; PIAZZA, R. M.; NARA, J. M.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Slot blot immunoassay as a tool for plasmid-encoded toxin detection in enteroaggregative *Escherichia coli* culture supernatants. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 55, p. 101-106, 2006.

VIMONT, S.; BOYD, A.; BLEIBTREU, A.; BENS, M.; GOUJON, J. M.; GARRY, L.; CLERMONT, O.; DENAMUR, E.; ARLET, G.; VANDEWALLE, A. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. **PLoS One**, v. 7, p. e46547, 2012.

WAKIMOTO, N.; NISHI, J.; SHEIKH, J.; NATARO, J. P.; SARANTUYA, J.; IWASHITA, M.; MANAGI, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; KAWANO, Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, p. 687-690, 2004.

WALLACE, A. J.; STILLMAN, T. J.; ATKINS, A.; JAMIESON, S. J.; BULLOUGH, P. A.; GREEN, J.; ARTYMIUK, P. J. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. **Cell**, v. 100, p. 265-276, 2000.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J Med Microbiol**, v. 56, p. 4-8, 2007.

WESTERMARK, M.; OSCARSSON, J.; MIZUNOE, Y.; URBONAVICIENE, J.; UHLIN, B. E. Silencing and activation of ClyA cytotoxin expression in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 182, p. 6347-6357, 2000.

WICK, R. R.; JUDD, L. M.; GORRIE, C. L.; HOLT, K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Comput Biol**, v. 13, p. e1005595, 2017.

WRIGHT, K. J.; SEED, P. C.; HULTGREN, S. J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. **Cell Microbiol**, v. 9, p. 2230-2241, 2007.

WYBORN, N. R.; STAPLETON, M. R.; NORTE, V. A.; ROBERTS, R. E.; GRAFTON, J.; GREEN, J. Regulation of *Escherichia coli* hemolysin E expression by H-NS and Salmonella SlyA. **J Bacteriol**, v. 186, p. 1620-1628, 2004.

YAMAJI, R.; FRIEDMAN, C. R.; RUBIN, J.; SUH, J.; THYS, E.; MCDERMOTT, P.; HUNG-FAN, M.; RILEY, L. W. A population-based surveillance study of shared genotypes of *Escherichia coli* isolates from retail meat and suspected cases of urinary tract infections. **mSphere**, v. 3, 2018.

ZAMANI, H.; SALEHZADEH, A. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. **Turk J Med Sci**, v. 48, p. 162-167, 2018.

ZANKARI, E.; HASMAN, H.; COSENTINO, S.; VESTERGAARD, M.; RASMUSSEN, S., LUND, O.; AARESTRUP, F. M.; LARSEN, M. V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 2640-2644, 2012.

ZHAO, F.; YANG, H.; BI, D.; KHALEDI, A.; QIAO, M. A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections. **Microb Pathog**, v. 144, p. 104196, 2020.

ZHOU, G.; MO, W. J.; SEBBEL, P.; MIN, G.; NEUBERT, T. A.; GLOCKSHUBER, R.; WU, X. R.; SUN, T. T.; KONG, X. P. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. **J Cell Sci**, v. 114, p. 4095-4103, 2001.

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.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela com características gerais das linhagens de *E. coli* utilizadas para a construção da primeira árvore filogenética (Figura 17)

Cepa de <i>E. coli</i>	Nº de acesso no GenBank	Patotipo	Filogrupo	ST	País de isolamento	Fonte de isolamento	Hospedeiro	Sorotipo
042	GCA_000027125.1	EAEC	D	410	Peru	Fezes	Humano	O44:H18
11128	GCA_000010765.1	STEC	B1	16	Japão	Fezes	Humano	O111:H-
11368	GCA_000091005.1	STEC	B1	21	Japão	Fezes	Humano	O26:H11
12009	GCA_000010745.1	STEC	B1	17	Japão	Fezes	Humano	O103:H2
2009EL-2050	GCA_000299255.1	EAEC/STEC	B1	678	Georgia	Fezes	Humano	O104:H4
2009EL-2071	GCA_000299475.1	EAEC/STEC	B1	678	Georgia	Fezes	Humano	O104:H4
2011C-3493	GCA_000299455.1	EAEC/STEC	B1	678	EUA	Fezes	Humano	O104:H5
536	GCA_000013305.1	ExPEC	B2	73	ND	Urine	Humano	O6:K15:H31
55989	GCA_000026245.1	EAEC	B1	678	RCA	Fezes	Humano	N.D.
81009	GCA_002157245.1	ExPEC	B2	131	EAU	Urina	Humano	O25b:H4
ABU 83972	GCA_000148365.1	ExPEC	B2	73	ND	Urine	Humano	ND
APEC O1	GCA_000014845.1	ExPEC	B2	95	ND	Fígado	Frango	O1:K1
APEC O78	GCA_000332755.1	ExPEC	C	23	ND	Fígado	Peru	O78
ATCC 8739	GCA_000019385.1	Comensal	A	3021	ND	ND	ND	ND
B REL606	GCA_000017985.1	Comensal	A	93	ND	ND	ND	ND
B7A	GCA_000167815.1	ETEC	B1	94	Vietnã	Fezes	Humano	O148:H28
CB9615	GCA_000025165.1	EPEC	E	335	Alemanha	Fezes	Humano	O55:H7
CE10	GCA_000227625.1	ExPEC	F	62	ND	Líquido cerebral	Humano	O7:K1
CFT073	GCA_000007445.1	ExPEC	B2	73	ND	Urina	Humano	O6:K2:H1
DH1	GCA_000270105.1	Comensal	A	1060	ND	ND	ND	ND
E2348/69	GCA_000026545.1	EPEC	B2	15	Reino Unido	Fezes	Humano	O127:H6
E24377A	GCA_000017745.1	ETEC	B1	1132	ND	ND	ND	O139:H28
EC4115	GCA_000021125.1	STEC	E	11	ND	ND	ND	O157:H7
EC958	GCA_000285655.3	ExPEC	B2	131	Reino Unido	Urine	Humano	O25b:K100:H4
ED1a	GCA_000026305.1	Comensal	B2	452	França	Fezes	Humano	O81
EDL933	GCA_000732965.1	STEC	E	11	EUA	Carne	ND	O157:H7

(continua)

(conclusão)

Cepa de <i>E. coli</i>	Nº de acesso no GenBank	Patotipo	Filogrupo	ST	País de isolamento	Fonte de isolamento	Hospedeiro	Sorotipo
H10407	GCA_000210475.1	ETEC	A	48	Bangladesh	Fezes	Humano	O78:H11:K80
HS	GCA_000017765.1	Comensal	A	46	EUA	Fezes	Humano	O9
IAI1	GCA_000026265.1	Comensal	B1	1128	França	Fezes	Humano	O8
IAI39	GCA_000026345.1	ExPEC	F	62	França	Urina	Humano	O7:K1
IHE3034	GCA_000025745.1	ExPEC	B2	95	Finlândia	Líquido cerebral	Humano	O18:K1:H7
K-12 MG1655	GCA_000005845.2	Comensal	A	10	ND	Fezes	Humano	ND
LF82	GCA_000284495.1	AIEC	B2	135	ND	Doença de Crohn	Humano	ND
NA114	GCA_000214765.3	ExPEC	B2	131	ND	Urina	Humano	ND
NRG 857C	GCA_000183345.1	AIEC	B2	135	ND	Doença de Crohn	Humano	O83:H1
PCN033	GCA_000219515.3	ExPEC	D	5147	ND	ND	ND	ND
PMV-1	GCA_000493595.1	ExPEC	B2	95	ND	ND	ND	O18:K1
RM12579	GCA_000245515.1	EPEC	E	335	USA	ND	Humano	O55:H7
S88	GCA_000026285.2	ExPEC	B2	95	França	Líquido cerebral	Humano	O45:K1:H7
SA186	GCA_003856995.1	ExPEC	B2	131	Arábia Saudita	Urina	Humano	ND
Sakai	GCA_000008865.2	STEC	E	11	Japão	Fezes	Humano	O157:H7
SE11	GCA_000010385.1	Comensal	B1	156	ND	ND	ND	O152:H28
SE15	GCA_000010485.1	Comensal	B2	131	ND	ND	ND	O150:H5
SMS-3-5	GCA_000019645.1	Ambiental	F	354	EUA	Meio ambiente	Água	ND
UM146	GCA_000148605.1	AIEC	B2	643	ND	Doença de Crohn	Humano	ND
UMN026	GCA_000026325.2	ExPEC	D	597	EUA	Urine	Humano	O17:K52:H18
UMNF18	GCA_000220005.2	ETEC	A	10	EUA	Fezes	Porco	O147:H?
UMNK88	GCA_000212715.2	ETEC	A	100	EUA	Fezes	Porco	ND
UTI89	GCA_000013265.1	ExPEC	B2	95	ND	Urina	Humano	O18:K1:H7
W	GCA_008868305.1	Comensal	B1	1079	ND	ND	ND	ND
Xuzhou21	GCA_000262125.1	STEC	E	11	China	Fezes	Humano	O157:H7

Todas as informações presentes na tabela foram obtidas pelo número de acesso da cepa no *GenBank* do NCBI.

ND, não disponível.

APÊNDICE B – Tabela com características gerais das linhagens de *E. coli* utilizadas para a construção da segunda árvore filogenética (Figura 18)

Cepa de <i>E. coli</i>	Nº de acesso no GenBank	Patotipo	Filogrupo	ST	País de isolamento	Fonte de isolamento	Hospedeiro	Sorotipo
042	GCA_000027125.1	EAEC	D	410	Peru	Fezes/diarreia	Humano	O44:H18
101-1	GCA_000168095.1	EAEC	A	5655	Japão	Fezes/diarreia	Humano	O?:H10
1-182-04_S4_C1	GCA_000627175.1	EAEC	B1	2186	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O182:H23
118UI	GCA_003627855.1	UPEC	D	69	México	Urina/ITU	Humano	ND
1-392-07_S1_C1	GCA_000703865.1	EAEC	D	38	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O86:H5
2/0	GCA_003856635.1	UPEC	B2	131	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND
2-005-03_S3_C1	GCA_000703805.1	EAEC	B1	2178	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O81:H27
2-011-08_S3_C3	GCA_000687065.1	EAEC	A	10	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O128ab/ac:H10
2-052-05_S4_C2	GCA_000703385.1	EAEC	B1	1891	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O121:H7
2-156-04_S3_C3	GCA_000703745.1	EAEC	A	165	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O80:H19
2-177-06_S4_C3	GCA_000703565.1	EAEC	B1	678	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O104:H4
2-222-05_S1_C1	GCA_000703965.1	EAEC	B1	5376	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O39:H12
2-316-03_S4_C2	GCA_000704325.1	EAEC	A	10	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O?:H10
2-460-02_S3_C1	GCA_000704465.1	EAEC	A	3281	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O111:H12
2-460-02_S4_C2	GCA_000704525.1	EAEC	A	43	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O6:H10
2-474-04_S3_C3	GCA_000704665.1	EAEC	A	43	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O?:H10
3-020-07_S4_C2	GCA_000704805.1	EAEC	B1	5616	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O131:H8
3-475-03_S1_C2	GCA_000713905.1	EAEC	B1	200	Tanzânia	Fezes/diarreia	Humano	O127:H27
381-3	GCA_000948005.1	EAEC	A	10	Holanda	Fezes/diarreia	Humano	O126:H2
4/0	GCA_003856615.1	UPEC	B2	131	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND
536	GCA_000013305.1	UPEC	B2	73	ND	Urina/ITU	Humano	O6:K15:H31
5-366-08_S3_C1	GCA_000714335.1	EAEC	D	2	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O?:H18
55989	GCA_000026245.1	EAEC	B1	678	RCA	Fezes/diarreia	Humano	ND
6-175-07_S1_C2	GCA_000711375.1	EAEC	D	38	Tanzânia	Fezes/diarreia	Humano	O153var1:H2
ATCC 700415	GCA_003491265.1	UPEC	B2	?	EUA	Urina/ITU	Humano	O4:H5
BH100	GCA_002887715.1	UPEC	B2	127	Brasil	Urina/ITU	Humano	ND

(continua)

(conclusão)

Cepa de <i>E. coli</i>	Nº de acesso no GenBank	Patotipo	Filogrupo	ST	País de isolamento	Fonte de isolamento	Hospedeiro	Sorotipo
C43/90	GCA_000350045.2	EAEC	A	10	Suécia	Fezes	Humano	O127:H27
C48/93	GCA_000350025.2	EAEC	A	34	Suécia	Fezes	Humano	ONT:H33
CFT073	GCA_000007445.1	UPEC	B2	73	ND	Urina/ITU	Humano	O6:K2:H1
CLSC36	GCA_006777045.1	UPEC	F	648	Canada	Urina/ITU	Humano	O1:H42
CS01	GCA_000740545.1	EAEC	A	?	EUA	Fezes	Humano	O?:H30
EC1515	GCA_002196495.1	UPEC	E	219	Taiwan	Urina/ITU	Humano	ND
EC958	GCA_000285655.3	UPEC	B2	131	Reino Unido	Urina/ITU	Humano	O25b:K100:H4
EC974	GCA_002196475.1	UPEC	E	219	Taiwan	Urina/ITU	Humano	ND
F11	GCA_000167835.1	UPEC	B2	127	EUA	Urina/ITU	Humano	O6:H31
IAI39	GCA_000026345.1	UPEC	F	62	França	Urina/ITU	Humano	O7:K1
IS1	GCA_000513455.1	EAEC	D	38	Áustria	Fezes	Humano	ND
J96	GCA_000295775.2	UPEC	B2	12	ND	Urina/ITU	Humano	O4:K6
K1516	GCA_000617985.2	EAEC	D	31	EUA	ND	ND	O15:H18
KL53	GCA_002494365.2	UPEC	A	1434	Eslováquia	Urina/ITU	Humano	O18:H14
MNCRE44	GCA_000931565.1	UPEC	B2	131	EUA	ND	Humano	ND
MS6198	GCA_001721525.1	UPEC	F	648	Reino Unido	Urina/ITU	Humano	ND
MS7163	GCA_003020885.1	UPEC	B2	95	Eslováquia	Urina/ITU	Humano	O45:K1:H7
MSHS 133	GCA_006777085.1	UPEC	G	117	Canadá	Urina/ITU	Humano	O24:NM
MSHS 472	GCA_006777065.1	UPEC	A	101	Canadá	Urina/ITU	Humano	O82:NM
NA114	GCA_000214765.3	UPEC	B2	131	ND	Urina/ITU	Humano	ND
NU14	GCA_002024865.1	UPEC	B2	95	USA	Urina/ITU	Humano	ND
SA186	GCA_003856995.1	UPEC	B2	131	Arábia Saudita	Urina/ITU	Humano	ND
U13A	GCA_004135165.1	UPEC	B2	131	EUA	Urina/ITU	Humano	ND
UMN026	GCA_000026325.2	UPEC	D	597	EUA	Urina/ITU	Humano	O17:K52:H18
UPEC 26-1	GCA_001693315.1	UPEC	B2	73	Coreia do Sul	Urina/ITU	Humano	ND
UTI89	GCA_000013265.1	UPEC	B2	95	ND	Urina/ITU	Humano	O18:K1:H7
ZRUEC59	GCA_004193385.1	UPEC	D	38	Paquistão	Urina/ITU	Humano	O1:H15

Todas as informações presentes na tabela foram obtidas pelo número de acesso da cepa no *GenBank* do NCBI. ND, não disponível; RCA, República Centro Africana.

APÊNDICE C – Tabela com características gerais das linhagens de *E. coli* utilizadas para a construção da terceira árvore filogenética (Figura 19)

Cepa de <i>E. coli</i>	Nº de acesso no GenBank	Patotipo	Filogrupo	ST	País de isolamento	Fonte de isolamento	Hospedeiro	Sorotipo
1-110-08_S1_C1	GCA_000601315.1	ETEC	A	10	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O159:H4
1-110-08_S1_C3	GCA_000601295.1	ETEC	A	10	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O159:H4
1283	GCA_002310735.1	ExPEC	A	10	Reino Unido	Urina/ITU	Cachorro	ND
1303	GCA_000829985.1	ExPEC	A	10	Alemanha	Mastite	Bovino	O70:H32
23.916	GCA_000194535.2	STEC	A	10	ND	Fezes	Porco	O147:H4
2-011-08_S3_C1	GCA_000700505.1	EAEC	A	10	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O?:H10
2-011-08_S3_C3	GCA_000687065.1	EAEC	A	10	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O?:H10
2-316-03_S4_C2	GCA_000704325.1	EAEC	A	10	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O?:H10
252	GCA_007858995.1	EPEC, ExPEC	A	10	Brasil	Urina/ITU	Humano	ND
26561	GCA_003033905.1	ExPEC	A	10	França	Mastite	Bovino	ND
2726950	GCA_000356145.2	ETEC	A	10	Bangladesh	Fezes	Humano	ND
3522-6	GCA_003651375.1	EPEC	A	10	Brasil	Fezes/diarreia	Humano	O129:H11
381-3	GCA_000948005.1	EAEC	A	10	Holanda	Fezes/diarreia	Humano	O126:H2
4581-2	GCA_003651325.1	EPEC	A	10	Brasil	Fezes/diarreia	Humano	NT:H40
7-233-03_S3_C1	GCA_000713235.1	EAEC	A	10	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O?:H10
7-233-03_S3_C3	GCA_000713355.1	EAEC	A	10	Tanzânia	Fezes/sem diarreia	Humano	O?:H10
AP155	GCA_003584245.1	EPEC	A	10	Brasil	Fezes/diarreia	Cachorro	O111:H25
ATCC_23506	GCA_000333175.1	ExPEC	A	10	ND	Urina	Humano	O10:K5(L):H4
B41	GCA_000194705.2	ETEC	A	10	EUA	Fezes	Porco	O101:HNM
BCE011_MS-01	GCA_000356285.2	ETEC	A	10	Bangladesh	Fezes	Humano	ND
blood-09-0249	GCA_000782275.1	ExPEC	A	10	EUA	Sangue	Humano	ND
blood-09-1290	GCA_000781915.1	ExPEC	A	10	EUA	Sangue	Humano	ND
blood-10-1009	GCA_000779005.1	ExPEC	A	10	EUA	Sangue	Humano	ND
C260_92	GCA_000446325.2	EPEC	A	10	Itália	Fezes	Humano	ND
C43/90	GCA_000350045.2	EAEC	A	10	Suécia	Fezes	Humano	O127:H27
ECC-Z	GCA_000498235.1	ExPEC	A	10	EUA	Mastite	Bovino	ND

(continua)

(continuação)

Cepa de <i>E. coli</i>	Nº de acesso no GenBank	Patotipo	Filogrupo	ST	País de isolamento	Fonte de isolamento	Hospedeiro	Sorotipo
EPEC_631	GCA_001742485.1	EPEC	A	10	Holanda	Fezes	Humano	O157:H16
H7	GCA_001900455.1	Ambiental	A	10	ND	Ambiental	Água	ND
ICBEC13AM	GCA_001982555.1	Ambiental	A	10	Brasil	Ambiental	Água	ND
ICBECAM7	GCA_002018425.1	Ambiental	A	10	Brasil	Ambiental	Água	ND
IH57218	GCA_001264215.1	STEC; ETEC	A	10	Finlândia	Fezes/diarreia	Humano	O2:H27
K-12 MG1655	GCA_000005845.2	Comensal	A	10	ND	Fezes	Humano	ND
MER701	GCA_009659595.1	Ambiental	A	10	China	Ambiental	Espinafre	ND
MN067	GCA_001881515.1	Comensal	A	10	Índia	Fezes	Humano	ND
P12b	GCA_000257275.1	Comensal	A	10	ND	ND	ND	O15:H17
RM10410	GCA_008065455.1	STEC	A	10	EUA	Fezes	Vaca	O113:H4
S17	GCA_000340255.1	ExPEC	A	10	Brasil	Fígado	Frango	O113:H4
SC352	GCA_003358245.1	Ambiental	A	10	EUA	Ambiental	Água	ND
SC356	GCA_003358185.1	Ambiental	A	10	EUA	Ambiental	Água	ND
STEC_2236	GCA_001607125.1	STEC	A	10	Holanda	Fezes/diarreia	Humano	O113:H4
STEC_2708	GCA_001607685.1	STEC	A	10	Holanda	Fezes/diarreia	Humano	O110:H9
STEC_2953	GCA_001607895.1	STEC	A	10	Holanda	Fezes/diarreia	Humano	O113:H4
STEC_545	GCA_001609745.1	STEC	A	10	Holanda	Fezes/diarreia	Humano	O9:H9
STEC_EH250	GCA_000225145.2	STEC	A	10	ND	Fezes	Humano	ND
TW15901	GCA_000304075.2	EPEC	A	10	França	Comida	Carne	ND
UMEA_3139-1	GCA_000460275.1	ExPEC	A	10	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND
UMEA_3150-1	GCA_000460335.1	ExPEC	A	10	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND
UMEA_3174-1	GCA_000460555.1	ExPEC	A	10	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND
UMEA_3199-1	GCA_000460715.1	ExPEC	A	10	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND
UMEA_3271-1	GCA_000461115.1	ExPEC	A	10	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND
UMEA_3318-1	GCA_000461235.1	ExPEC	A	10	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND
UMEA_3592-1	GCA_000461395.1	ExPEC	A	10	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND
UMEA_3889-1	GCA_000461755.1	ExPEC	A	10	Suécia	Urina/ITU	Humano	ND

(continua)

(conclusão)

Cepa de <i>E. coli</i>	Nº de acesso no <i>GenBank</i>	Patotipo	Filogrupo	ST	País de isolamento	Fonte de isolamento	Hospedeiro	Sorotipo
UMNF18	GCA_000220005.2	ETEC	A	10	EUA	Fezes/diarreia	Porco	O147:H?
upec-127	GCA_000780965.1	ExPEC	A	10	EUA	Urina/ITU	Humano	ND
upec-173	GCA_000779955.1	ExPEC	A	10	EUA	Urina/ITU	Humano	ND
upec-282	GCA_000777535.1	ExPEC	A	10	EUA	Urina/ITU	Humano	ND
upec-83	GCA_000776355.1	ExPEC	A	10	EUA	Urina/ITU	Humano	ND
VR50	GCA_000968515.1	ExPEC	A	10	ND	Urina/bacteriúria assintomática	Humano	OR:K1:H-

Todas as informações presentes na tabela foram obtidas pelo número de acesso da cepa no *GenBank* do NCBI.
ND, não disponível.

APÊNDICE D – Fatores de virulência presentes na cepa UPEC-46

Classe	Fator de virulência	Sequência de referência	Cobertura (%)	Identidade (%)	e-value
Adesão/invasão	Aap	EC042_pAA055	100	91,4	2,00E-75
Adesão/invasão	AatA	EC042_pAA008	100	89,6	0
Adesão/invasão	AatB	EC042_pAA009	100	91	3,00E-141
Adesão/invasão	AatC	EC042_pAA010	100	90,4	2,00E-136
Adesão/invasão	AatD	EC042_pAA011	100	86,9	0
Adesão/invasão	AatP	EC042_pAA007	100	91,2	0
Adesão/invasão	CsgG	Z1672	100	100	0
Adesão/invasão	CsgF	Z1671	100	99,3	3,00E-99
Adesão/invasão	CsgE	Z1672	100	100	4,00E-95
Adesão/invasão	CsgD	Z1673	100	99,1	2,00E-161
Adesão/invasão	CsgB	Z1675	100	100	9,00E-107
Adesão/invasão	CsgA	Z1676	100	96,7	5,00E-101
Adesão/invasão	CsgC	Z1677	100	98,2	2,00E-75
Adesão/invasão	IbeB	ECOK1_0581	100	98,7	0
Adesão/invasão	IbeC	ECOK1_4427	100	99,1	0
Adesão/invasão	Nlpl	ECS88_3547	100	100	0
Adesão/invasão	OmpA	Z1307	100	100	0
Bacteriocina	ColE1	P02978.1	100	86	0
Bacteriocina	McbD	P23186.1	100	99,7	0
Bacteriocina	McbE	WP_000258040.1	100	100	7,00E-176
Bacteriocina	McbF	P05529.1	100	100	0
Bacteriocina	McbG	WP_000351266.1	100	99,5	8,00E-135
Fímbria CU	FimB	UTI89_C5009	100	99,5	7,00E-152
Fímbria CU	FimE	UTI89_C5010	100	99,5	3,00E-148
Fímbria CU	FimA	UTI89_C5011	100	92,9	1,00E-108
Fímbria CU	FimI	UTI89_C5012	77	98,2	8,00E-122
Fímbria CU	FimC	UTI89_C5013	100	99,2	5,00E-180
Fímbria CU	FimD	UTI89_C5014	100	99,3	0
Fímbria CU	FimF	UTI89_C5015	100	98,9	3,00E-129
Fímbria CU	FimG	UTI89_C5016	100	98,2	3,00E-119
Fímbria CU	FimH	UTI89_C5017	100	98,3	0
Fímbria CU	SfmA	b0530	100	100	9,00E-130
Fímbria CU	SfmC	b0531	100	100	2,00E-171
Fímbria CU	SfmD	b0532	100	99,5	0
Fímbria CU	SfmH	b0533	100	99,4	0
Fímbria CU	SfmF	b0534	100	100	3,00E-125
Fímbria CU	SfmZ	b0535	100	100	3,00E-156
Fímbria CU	EcpE	Z0356	94	97	5,00E-174
Fímbria CU	EcpC	Z0358	100	99,5	0
Fímbria CU	EcpB	Z0359	100	98,6	4,00E-165
Fímbria CU	EcpA	Z0360	100	100	7,00E-139
Fímbria CU	EcpR	Z0361	92	97,2	1,00E-129
Fímbria CU	YcbQ	Z1286	98	98,9	4,00E-126
Fímbria CU	YcbR	Z1287	100	98,3	6,00E-173

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Sequência de referência	Cobertura (%)	Identidade (%)	e-value
Fímbria CU	YcbS	Z1288m	100	98,4	0
Fímbria CU	YcbT	Z1290	100	98,8	0
Fímbria CU	YcbU	Z1291	100	100	3,00E-114
Fímbria CU	YcbV	Z1292	100	98,9	2,00E-137
Fímbria CU	YcbF	Z1293m	93	98,7	3,00E-166
Fímbria CU	GlhF	b3214	100	100	0
Fímbria CU	YhcA	b3215	100	100	5,00E-168
Fímbria CU	YhcD	b3216	100	100	0
Fímbria CU	YhcE	b4569	100	100	7,00E-134
Fímbria CU	YhcF	b3219	100	100	6,00E-177
Fímbria CU	YadN	b0141	100	100	2,00E-141
Fímbria CU	YadV	b0140	100	100	0
Fímbria CU	HtrE	b0139	100	100	0
Fímbria CU	YadM	b0138	100	100	3,00E-140
Fímbria CU	YadL	b0137	100	100	9,00E-147
Fímbria CU	YadK	b0136	100	100	2,00E-148
Fímbria CU	YadC	b0135	100	100	0
Fímbria CU	YbgD	b0719	100	100	2,00E-140
Fímbria CU	YbgQ	b0718	100	100	0
Fímbria CU	YbgP	b0717	100	100	0
Fímbria CU	YbgO	b0716	100	99,7	0
Fímbria CU	YfcV	b2339	100	100	8,00E-138
Fímbria CU	YfcU	EC042_2578	100	80	0
Fímbria CU	YfcS	b2336	100	100	0
Fímbria CU	YfcR	b2335	100	100	2,00E-125
Fímbria CU	YfcQ	b2334	100	100	3,00E-122
Fímbria CU	YfcP	b2333	100	100	8,00E-133
Fímbria CU	YfcO	b2332	100	100	0
Fímbria CU	YdeS	EC042_1636	100	99,4	3,00E-130
Fímbria CU	YdeR	EC042_1635	100	98,8	2,00E-123
Fímbria CU	YdeQ	EC042_1634	100	98,4	0
Fímbria CU	YraH	b3142	100	100	8,00E-144
Fímbria CU	YraI	b3143	100	100	5,00E-175
Fímbria CU	YraJ	b3144	100	100	0
Fímbria CU	YraK	b3145	100	100	0
Fímbria CU	YehD	b2111	100	98,9	1,00E-129
Fímbria CU	YehC	b2110	94	100	6,00E-165
Fímbria CU	YehB	b2109	100	100	0
Fímbria CU	YehA	b2108	100	100	0
Sistema aquisição ferro	CirA	c2690	100	99,7	0
Sistema aquisição ferro	EfeU	EC042_1093	100	99,6	0
Sistema aquisição ferro	EfeO	EC042_1094	100	98,9	0
Sistema aquisição ferro	EfeB	EC042_1095	100	98,6	0
Sistema aquisição ferro	EntD	c0668	96	95,5	5,00E-179
Sistema aquisição ferro	FepA	c0669	100	99,3	0

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Sequência de referência	Cobertura (%)	Identidade (%)	e-value
Sistema aquisição ferro	Fes	c0671	100	95,8	0
Sistema aquisição ferro	EntF	c0673	100	97	0
Sistema aquisição ferro	FepE	c0674	100	95,2	0
Sistema aquisição ferro	FepC	c0675	100	99,3	0
Sistema aquisição ferro	FepG	c0676	100	97,6	0
Sistema aquisição ferro	FepD	c0677	99	99,4	0
Sistema aquisição ferro	EntS	c0678	100	99,3	0
Sistema aquisição ferro	FepB	c0679	100	100	0
Sistema aquisição ferro	EntC	c0680	99	99,5	0
Sistema aquisição ferro	EntE	c0681	100	99,1	0
Sistema aquisição ferro	EntB	c0682	100	99,3	0
Sistema aquisição ferro	EntA	c0683	100	98,4	0
Sistema aquisição ferro	FecE	b4287	100	100	0
Sistema aquisição ferro	FecD	b4288	89	99,6	0
Sistema aquisição ferro	FecC	b4289	100	100	0
Sistema aquisição ferro	FecB	b4290	100	99,3	0
Sistema aquisição ferro	FecA	b4291	100	99,7	0
Sistema aquisição ferro	FecR	b4292	100	100	0
Sistema aquisição ferro	FecI	b4293	100	100	2,00E-128
Sistema aquisição ferro	FeoA	b3408	100	100	1,00E-52
Sistema aquisição ferro	FeoB	b3409	100	100	0
Sistema aquisição ferro	FeoC	b3410	100	100	1,00E-53
Sistema aquisição ferro	FhuA	b0150	100	100	0
Sistema aquisição ferro	FhuC	b0151	100	100	0
Sistema aquisição ferro	FhuD	b0152	100	100	0
Sistema aquisição ferro	FhuB	b0153	100	99,8	0
Sistema aquisição ferro	FhuE	b1102	100	100	0
Sistema aquisição ferro	FhuF	b4367	100	96,2	0
Sistema aquisição ferro	YbtS	c2419	100	99,3	0
Sistema aquisição ferro	YbtX	c2420	91	99,5	0
Sistema aquisição ferro	YbtQ	c2421	99	99,3	0
Sistema aquisição ferro	YbtP	c2422	100	99,3	0
Sistema aquisição ferro	YbtA	c2423	100	99,7	0
Sistema aquisição ferro	Irp2	c2424	99	99,4	0
Sistema aquisição ferro	Irp1	c2429	96	99,4	0
Sistema aquisição ferro	YbtU	c2430	100	99,7	0
Sistema aquisição ferro	YbtT	c2432	100	99,1	7,00E-161
Sistema aquisição ferro	YbtE	c2433	100	100	0
Sistema aquisição ferro	FyuA	c2436	100	100	0
Resistência sérica	Bor	O1CoBM146	95	90,7	1,00E-57
Resistência sérica	GfcA	EC1303_c10070	100	100	1,00E-60
Resistência sérica	GfcB	EC1303_c10060	100	100	2,00E-162
Resistência sérica	GfcC	EC1303_c10050	100	100	0
Resistência sérica	GfcD	EC1303_c10040	100	100	0
Resistência sérica	GfcE	EC1303_c10030	100	100	0

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Sequência de referência	Cobertura (%)	Identidade (%)	e-value
Resistência sérica	Etp	EC1303_c10020	100	100	7,00E-111
Resistência sérica	Etk	EC1303_c10010	100	100	0
SST2	GspB	b3322	100	100	2,00E-102
SST2	GspA	b3323	100	100	0
SST2	GspC	b3324	100	99,6	0
SST2	GspD	b3325	100	99,8	0
SST2	GspE	b3326	100	100	0
SST2	GspF	b3327	100	100	0
SST2	GspG	b3328	100	100	5,00E-106
SST2	GspH	b3329	100	100	2,00E-124
SST2	Gspl	b3330	100	100	2,00E-89
SST2	GspJ	b3331	100	100	4,00E-144
SST2	GspK	b3332	100	100	0
SST2	GspL	b3333	100	100	0
SST2	GspM	b3334	100	99,3	2,00E-112
SST2	GspO	b3335	100	99,6	2,00E-162
SST2	GspM	ECW_m3226	100	93,8	8,00E-123
SST3	EspX4	Z5636	84	88,7	0
SST3	EspX5	Z5665	100	95,8	0
SST3	EspY1	Z0065	88	81	3,00E-131
SST3	YqeH	EC042_3044	100	100	1,00E-161
SST3	YqeI	EC042_3045	100	95,5	0
SST3	YgeG	EC042_3049	100	93,9	3,00E-114
SST3	YgeK	EC042_3053	70	98,6	8,00E-108
SST3	OrgB	EC042_3054	100	88,5	4,00E-142
SST3	EprK	EC042_3056	100	97,5	6,00E-180
SST3	EprJ	EC042_3057	100	97,3	2,00E-76
SST3	EprI	EC042_3058	100	98,7	3,00E-54
SST3	EprH	EC042_3059	100	96,2	0
SST3	EtrA	EC042_3060	100	95,2	1,00E-117
SST3	EivH	EC1303_c29800	100	100	7,00E-70
SST3	EpaR	EC042_3062	100	97,6	0
SST3	EpaQ	EC042_3063	100	100	2,00E-59
SST3	EpaP	EC042_3064	100	97,3	5,00E-152
SST3	EpaO	EC042_3065	100	90,8	0
SST6	ImpA	E1470_c02190	100	100	0
SST6	Yhhl_1	E1470_c02390	100	98,6	0
SST6	AaiA	EC042_4562	100	93	8,00E-109
SST6	AaiB	EC042_4563	100	96,3	0
SST6	AaiD	EC042_4565	100	87,9	2,00E-87
SST6	AaiE	EC042_4566	100	86,8	0
SST6	AaiF	EC042_4568	100	86,5	0
SST6	VgrG	EC042_4569	99	80,3	0
SST6	AaiH	EC042_4570	99	77,3	4,00E-91
SST6	AaiI	EC042_4571	100	89,9	1,00E-58

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Sequência de referência	Cobertura (%)	Identidade (%)	e-value
SST6	AaiJ	EC042_4572	100	85,5	0
SST6	AaiK	EC042_4573	100	84,2	1,00E-117
SST6	AaiL	EC042_4574	96	85,8	0
SST6	AaiN	EC042_4575	100	75,5	4,00E-109
SST6	IcmF/AaiO	EC042_4576	92	79,7	0
SST6	ClpV/AaiP	EC042_4577	99	87,4	0
SST6	AaiT	EC042_4581	100	95,7	1,00E-138
SST6	Aec31	APECO1_1771	87	74,9	0
T4P	AfpA	KJD92105.1	100	83,82	4,00E-126
T4P	AfpA2	KJD92119.1	100	97,93	4,00E-142
T4P	AfpB	KJD92107.1	100	100	0
T4P	AfpC	KJD92108.1	100	99,26	0
T4P	AfpD	KJD92110.1	91	99,81	0
T4P	AfpE	KJD92111.1	100	99,4	0
T4P	AfpF	KJD92112.1	100	99,38	0
T4P	AfpG	KJD92106.1	100	100	2,00E-105
T4P	AfpH	KJD92114.1	100	100	3,00E-84
T4P	AfpI	KJD92115.1	85	85,09	8,00E-99
T4P	AfpJ	KJD92116.1	100	96,5	1,00E-158
T4P	AfpK	KJD92117.1	100	90,36	6,00E-111
T4P	AfpL	KJD92118.1	90	87,69	6,00E-76
T4P	AfpP	KJD92113.1	100	100	0
T4P	AfpR	KJD86186.1	96	99,62	0
T4P	AfpU	KJD92109.1	100	99,4	3,00E-122
SST5	AatA	ADJ53351	100	98,4	0
SST5	EhaC	Z3487	100	95,8	0
SST5	Pet	AF056581.1	100	98,3	0
SST5	UpaC	ECP_0433	100	82,5	0
SST5	UpaI	ECP_2276	100	82,5	0
Toxinas	AstA	AB042002	100	100	0
Toxinas	HlyE/ClyA	b1182	100	100	0
Flagelo	FlgN	Z1708	100	98,6	3,00E-98
Flagelo	FlgA	Z1710	100	95,9	1,00E-144
Flagelo	FlgB	Z1711	100	99,3	1,00E-99
Flagelo	FlgC	Z1712	100	100	2,00E-95
Flagelo	FlgD	Z1713	100	98,7	9,00E-163
Flagelo	FlgE	Z1714	100	95	0
Flagelo	FlgF	Z1715	100	99,6	0
Flagelo	FlgG	Z1716	100	100	0
Flagelo	FlgH	Z1717	100	100	6,00E-173
Flagelo	FlgI	Z1718	100	99,7	0
Flagelo	FlgJ	Z1719	100	99,4	0
Flagelo	FlgK	Z1720	100	98,9	0
Flagelo	FlgL	Z1721	100	98,1	0
Flagelo	FlhE	Z2931	100	97,7	2,00E-90

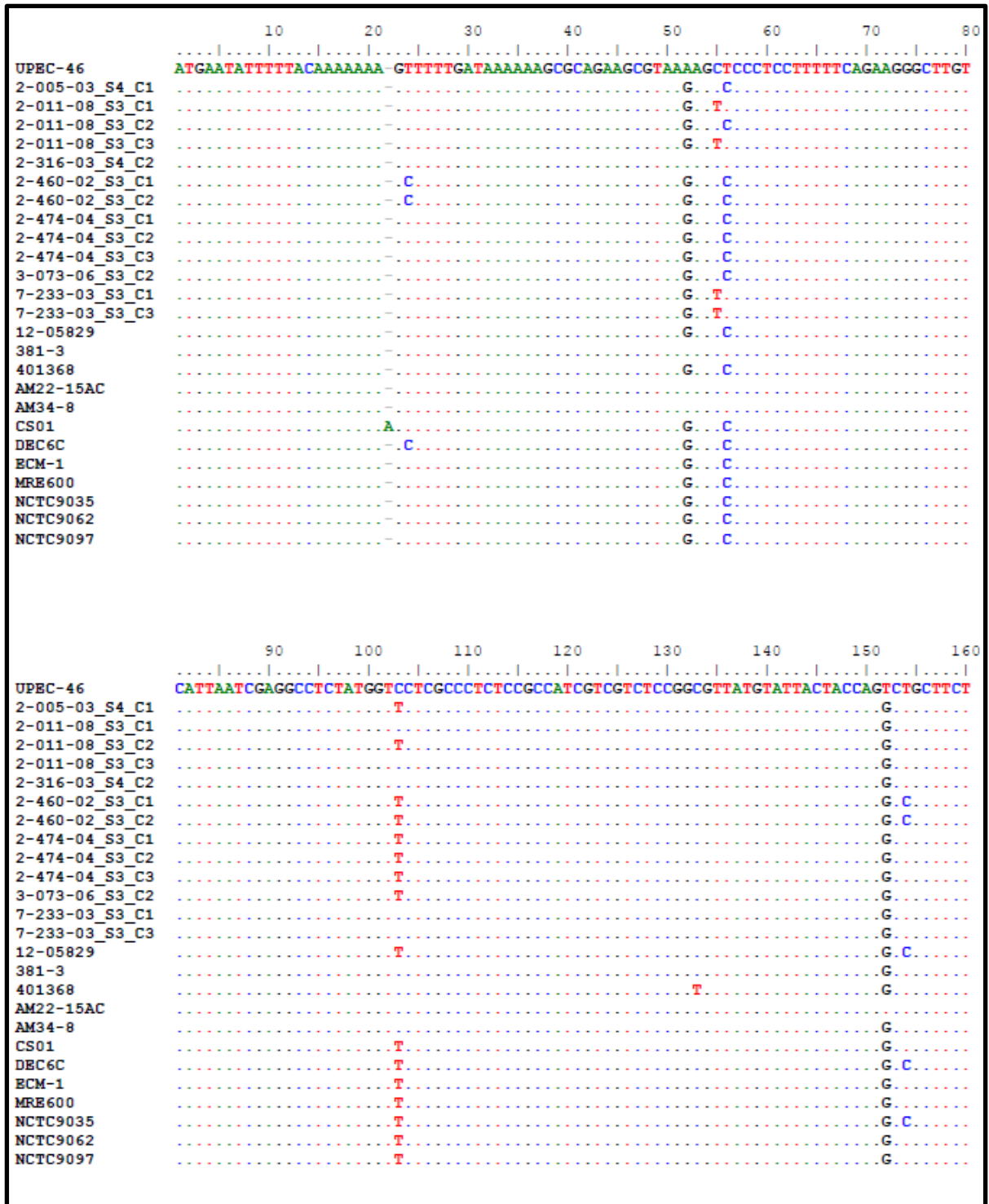
(continua)

(conclusão)

Classe	Fator de virulência	Sequência de referência	Cobertura (%)	Identidade (%)	e-value
Flagelo	FlhA	Z2932	100	99,6	0
Flagelo	FlhB	Z2934	100	98,7	0
Flagelo	CheZ	Z2935	100	99,5	7,00E-157
Flagelo	CheY	Z2936	100	100	6,00E-92
Flagelo	CheB	Z2937	100	98,9	0
Flagelo	CheR	Z2938	100	99,7	0
Flagelo	Tar/CheM	Z2940	100	99,5	0
Flagelo	CheW	Z2941	100	99,4	7,00E-118
Flagelo	CheA	Z2942	100	99,4	0
Flagelo	MotB	Z2943	100	100	0
Flagelo	MotA	Z2944	100	99,3	0
Flagelo	FlhC	Z2945	100	100	6,00E-145
Flagelo	FlhD	Z2946	97	99,1	2,00E-82
Flagelo	FliY	Z3010	100	98,9	0
Flagelo	FliZ	Z3011	94	98,4	2,00E-136
Flagelo	FliA	Z3012	100	100	1,00E-175
Flagelo	FliD	Z3014	100	99,6	0
Flagelo	FliS	Z3015	100	98,5	5,00E-95
Flagelo	FliT	Z3016	100	99,2	2,00E-87
Flagelo	FliE	Z3027	100	100	8,00E-73
Flagelo	FliF	Z3028	100	99,5	0
Flagelo	FliG	Z3029	100	99,7	0
Flagelo	FliH	Z3030	100	99,6	1,00E-166
Flagelo	FliI	Z3031	100	100	0
Flagelo	FliJ	Z3032	100	100	7,00E-107
Flagelo	FliK	Z3033	100	96,3	0
Flagelo	FliL	Z3034	100	99,4	2,00E-112
Flagelo	FliM	Z3035	100	99,7	0
Flagelo	FliN	Z3036	100	100	7,00E-98
Flagelo	FliO	Z3037	100	98,3	2,00E-83
Flagelo	FliP	Z3038	100	100	2,00E-174
Flagelo	FliQ	Z3039	100	100	2,00E-58
Flagelo	FliR	Z3040	100	99,2	0
Flagelo	FliK	Z3583	100	99,1	0
Flagelo	LfhA	EC042_0245	82	97,6	0

A tabela deste apêndice apresenta todos os fatores de virulência encontrados no genoma da cepa UPEC-46. Para a determinação destes fatores de virulência foram pesquisadas 1.154 sequências de proteínas deduzidas de genes associados à virulência. Uma pesquisa automatizada de homólogos de proteínas em genomas bacterianos anotados e a identificação de fatores de virulência foram processadas com o *pipeline 'prot_finder'* da coleção de '*bac-genomics-scripts*' usando o programa *BLASTp+* com as seguintes opções de valores: 1×10^{-10} de ponto de corte para o valor E ('-evalue 1e-10'), 70% de ponto de corte para a identidade e cobertura. A terceira coluna apresenta o número de acesso da sequência referência para cada fator de virulência, na qual a cepa UPEC-46 foi comparada. Os valores de cobertura (%), identidade (%) e *evalue* das análises de comparação estão representadas na quarta, quinta e sexta coluna, respectivamente. CU, *chaperona-usher*, SST2, sistema de secreção do tipo II; SST3, sistema de secreção do tipo III; SST5, sistema de secreção do tipo V; SST6, sistema de secreção do tipo VI; T4P, *pilus* tipo IV.

APÊNDICE E – Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *afpA* de diferentes cepas AFP⁺



	170	180	190	200	210	220	230	240
UPBC-46	GACAATAACAAGACTCAGAGCACCGTCTCCGAAGTCATGAGTATCGTCTCCGCTGTTAACGGTCTCTACGTCGGTACTTC							
2-005-03_S4_C1					A			C
2-011-08_S3_C1							T	A.G
2-011-08_S3_C2					A			C
2-011-08_S3_C3							T	A.G
2-316-03_S4_C2					A	T		
2-460-02_S3_C1		C					A	G.C
2-460-02_S3_C2		C					A	G.C
2-474-04_S3_C1					A			C
2-474-04_S3_C2					A			C
2-474-04_S3_C3					A			C
3-073-06_S3_C2					A			C
7-233-03_S3_C1							T	A.G
7-233-03_S3_C3							T	A.G
12-05829		C				A		A.G.C
381-3								
401368		A						C
AM22-15AC								
AM34-8								
CS01					A			C
DEC6C		C					A	G.C
ECM-1					A			C
MRE600					A			C
NCTC9035		C				A		A.G.C
NCTC9062					A			C
NCTC9097					A			C

	250	260	270	280	290	300	310	320												
UPBC-46	CGGTTATGAAGGGTTAAATGAATCCGTTATCCTCAAAACCTCTTCCGTCGCCGAAAAATTATAAGTCCAAGATGGAAAA																			
2-005-03_S4_C1	G	A	AC.G	C	G.T	C	TA.G	T	CG.A	C	C	A	T.C.C							
2-011-08_S3_C1	A.A	C	C.G	CC.C	AAAACC	A	AG.T	CG.A	T	C	A	A	T.CTC							
2-011-08_S3_C2	G	A	AC.G	C	G.T	C	TA.G	T	CG.A	C	C	A	T.C.C							
2-011-08_S3_C3	A.A	C	C.G	CC.C	AAAACC	A	AG.T	CG.A	T	C	A	A	T.CTC							
2-316-03_S4_C2		CC						A				C	A							
2-460-02_S3_C1	G	AC	TC	CC	GA.G	T	TA	C	CG	T	G	G	C	GGT	GA	AAT	TG			
2-460-02_S3_C2	G	AC	TC	CC	GA.G	T	TA	C	CG	T	G	G	C	GGT	GA	AAT	TG			
2-474-04_S3_C1	G	A	AC.G	C	G.T	C	TA.G	T	CG.A	C	C	A	T.C.C							
2-474-04_S3_C2	G	A	AC.G	C	G.T	C	TA.G	T	CG.A	C	C	A	T.C.C							
2-474-04_S3_C3	G	A	AC.G	C	G.T	C	TA.G	T	CG.A	C	C	A	T.C.C							
3-073-06_S3_C2	G	A	AC.G	C	G.T	C	TA.G	T	CG.A	C	C	A	T.C.C							
7-233-03_S3_C1	A.A	C	C.G	CC.C	AAAACC	A	AG.T	CG.A	T	C	A	A	T.CTC							
7-233-03_S3_C3	A.A	C	C.G	CC.C	AAAACC	A	AG.T	CG.A	T	C	A	A	T.CTC							
12-05829	G	A.G	ATC	C	G	T	TA	C	CG	T	G	G	C	GGT	G	A	T.T			
381-3		CC		TC					G				CC							
401368	G	C	AC.G	CA	GAT	C	A	G	T	CG	A	C	C	C	G	T	C			
AM22-15AC						T														
AM34-8		CC																		
CS01	GA	A	AC	GG	C	AAA	C	TA	G	T	CG	A	C	C	GGT	G	AAT	C		
DEC6C	G	AC	TC	C	G	T	TA	C	CG	T	G	G	C	GGT	GA	AAT	TG			
ECM-1	G	A	T	AC	G	CA	A	T	C	TA	G	T	CG	A	C	GA	GA	G	T	C
MRE600	G	AC	AC	G	CC	G	T	C	TA	G	T	CG	A	C	C	T				
NCTC9035	G	A	G	TC	CG	GG	T	TA	C	CG	T	G	G	C	GGT	G	T	T		
NCTC9062	G	A	AC	GG	CA	A	T	C	TA	G	T	CG	A	C	C	GA	GA	T	C	
NCTC9097	G	A	AC	G	C	G	T	C	TA	G	T	CG	A	C	C	GA	GA	T	C	

	330	340	350	360	370	380	390	400
UPEC-46	CCATTATGCATCCGTT	CGGGGGGAATCTGGCTCTGGGGCCAACACAAGGTTATACCGGCTATTATATTGAACTGACTAAG						
2-005-03_S4_C1	AA.C.CA.C	AG.AA.TAAAA.C	AGG.TA.T.G.C	TAAA.C	TC.AGG.T			
2-011-08_S3_C1	AG.C.C	CG.AG.TAAC.C	A.AGGTTA.CAAAGG	GGT.C	C.TC.A.G.T			
2-011-08_S3_C2	AA.C.CA.C	AG.AA.TAAAA.C	AGG.TA.T.G.C	TAAA.C	TC.AGG.T			
2-011-08_S3_C3	AG.C	CG.AG.TAAC.C	A.AGGTTA.CAAAGG	GGT.C	C.TC.A.G.T			
2-316-03_S4_C2		G.A	A		G.T			
2-460-02_S3_C1	AA.A	AC.AA.T.A.A.C	AG.ACT.A.GGC	TAAA.C	TC.A.G.T			
2-460-02_S3_C2	AA.A	AC.AA.T.A.A.C	AG.ACT.A.GGC	TAAA.C	TC.A.G.T			
2-474-04_S3_C1	AA.C.CA.C	AG.AA.TAAAA.C	AGG.TA.T.G.C	TAAA.C	TC.AGG.T			
2-474-04_S3_C2	AA.C.CA.C	AG.AA.TAAAA.C	AGG.TA.T.G.C	TAAA.C	TC.AGG.T			
2-474-04_S3_C3	AA.C.CA.C	AG.AA.TAAAA.C	AGG.TA.T.G.C	TAAA.C	TC.AGG.T			
3-073-06_S3_C2	AA.C.CA.C	AG.AA.TAAAA.C	AGG.TA.T.G.C	TAAA.C	TC.AGG.T			
7-233-03_S3_C1	AG.C	CG.AG.TAAC.C	A.AGGTTA.CAAAGG	GGT.C	C.TC.A.G.T			
7-233-03_S3_C3	AG.C	CG.AG.TAAC.C	A.AGGTTA.CAAAGG	GGT.C	C.TC.A.G.T			
12-05829	AA.A	AG.AA.TAA.A.CAAAG	TACT.A.G.CG	TAAA.C	TC.A.T			
381-3		G.A	A	AA.G.A	A.G.T			
401368	AT.C.C.C	A.A.CGA.T.AA	G	A.T.A.A.GG	TAAA.C	TC.A.G		
AM22-15AC				A				
AM34-8		A	A	A	G			
CS01	AA.C.A.C	AG.AA.T.AAA.CAAAG	G.TA	G.C	TAAA.C	ATC.AGG.A		
DEC6C	AA.A	AC.AA.T.A.A.C	AG.ACT.A.GGC	TAAA.C	TC.A.G.T			
ECM-1	AA.C.CA.C	AG.AA.T.AAA.C	AG.TGCC	A.C	TAAA.C	TC.AGG.T		
MRE600	AA.C.A.C	AG.AA.TAAAA.C	AG.TA.T.G.C	TAAA.C	TC.AGG.T			
NCTC9035	AA.A	AG.AA.T.A.A.C	AA.TGCT	A.CG	TAAA.C	TC.AA.T		
NCTC9062	AA.C.CA.C	AG.AA.T.AAA.C	AG.TA.C.T.A.C	TAAA.C	TC.AGG.T			
NCTC9097	AA.C.CA.C	AG.AA.TAAAA.C	AGA.TA.C.T.G.C	TAAA.C	TC.AGG.T			

	410	420	430	440	450	460	470	480
UPEC-46	ATTCCCTAAGAGTGCCTGTGTGAACCTCTCGTCAATGAACTTCGGGACCTCACTGGGGTGGTGTGGGGTTAAT							CGCC
2-005-03_S4_C1	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAAAA.ATGT
2-011-08_S3_C1	G.C.G.GC		G.C.C		T.ACA	G	C	CGGGGT.ATTA
2-011-08_S3_C2	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAAAA.ATGT
2-011-08_S3_C3	G.C.G.GC		G.C.C		T.ACA	G	C	CGGGGT.ATTA
2-316-03_S4_C2								ACAAA
2-460-02_S3_C1	G.C.G.GC	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAGTTAATG
2-460-02_S3_C2	G.C.G.GC	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAGTTAATG
2-474-04_S3_C1	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAAAA.ATGT
2-474-04_S3_C2	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAAAA.ATGT
2-474-04_S3_C3	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAAAA.ATGT
3-073-06_S3_C2	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAAAA.ATGT
7-233-03_S3_C1	G.C.G.C		G.C.C		T.ACA	G	C	CGGGGT.ATTA
7-233-03_S3_C3	G.C.G.C		G.C.C		T.ACA	G	C	CGGGGT.ATTA
12-05829	G.C.G.GC	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAACT.TG
381-3					G			T
401368	G.C.G.G	T	TG.C.C		A.T.T	CG	T	G.AGTTAATG
AM22-15AC								A
AM34-8								AAT.A
CS01	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAGATA.TG
DEC6C	G.C.AG.GC	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAGTTAATG
ECM-1	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAGCC.ATGT
MRE600	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAAAT.ATGT
NCTC9035	G.C.G.GC	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAACT.TG
NCTC9062	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAAACAATGT
NCTC9097	G.C.G.G	T	TG.C.C		T.T	CG	CA	GGAAAAATGT

	490	500	510	520	530	540	550	560
UPEC-46	G	AAGGGATCAGGGCAAGATATTTCTACTGTTAACGGTCAGAACGGTAA					CAAAAAC	TACACCAAAA
2-005-03_S4_C1	C	G AAC A CA C		AGGTAC ACAGGA A				ACTGCAAGCT
2-011-08_S3_C1	T	TCA G T CT G G ACGTG TC GC CCAACA GT			GCGATGCCAGCTCAGG		AATTTATG	T
2-011-08_S3_C2	C	G AAC A CA C		AGGTAC ACAGGA A				ACTGCAAGCT
2-011-08_S3_C3	T	TCA G T CT G G ACGTG TC GC CCAACA GT			GCGATGCCAGCTCAGG		AATTTATG	T
2-316-03_S4_C2	A	AAGGCT GG ACT A GA A	G	GTTAA ACT	T		GGT	T
2-460-02_S3_C1	C	GCAAC G CAAA GC C GTG CAC GG		ACAGGGA G			G GG CTG AG T	
2-460-02_S3_C2	C	GCAAC G CAAA GC C GTG CAC GG		ACAGGGA G			G GG CTG AG T	
2-474-04_S3_C1	C	G AAC A CA C		AGGTAC ACAGGA A				ACTGCAAGCT
2-474-04_S3_C2	C	G AAC A CA C		AGGTAC ACAGGA A				ACTGCAAGCT
2-474-04_S3_C3	C	G AAC A CA C		AGGTAC ACAGGA A				ACTGCAAGCT
3-073-06_S3_C2	C	G AAC A CA C		AGGTAC ACAGGA A				ACTGCAAGCT
7-233-03_S3_C1	T	TCA G T CT G G ACGTG TC GC CCAACA GT			GCGATGCCAGCTCAGG		AATTTATG	T
7-233-03_S3_C3	T	TCA G T CT G G ACGTG TC GC CCAACA GT			GCGATGCCAGCTCAGG		AATTTATG	T
12-05829	T	GTAAC G CAA A		GG AC AT A			G CTG TG GT	
381-3	G	GT A G A T A G T		G T CT A G			AGGT	T
401368	C	GCAAC G CT G G CAAGTA AGAA T		ACAGG A G			G CTG AG T	
AM22-15AC					A G			
AM34-8	A	GGT AA AT A AA T C G					AGCT	T C
CS01	C	GTAAC GAT CTAT C		AGGAAC				ACTGCAAGGT
DEC6C	C	CA C G AAAA GC C GTG CTC GG		ACAGGGA G			G G CTG AG T	
ECM-1	C	G ATC CA CA A		AGGTAC				TGCGACCT
MRE600	C	G AAC G CAA C		AGGTAC GCA CA A				ACTGCAAGCT
NCTC9035	T	GTA C G CAA A		AGG AC ACT CA C			GG CTG TG T	
NCTC9062	C	G A C CT CAA C		AGGTAC CA CA AG				TACTGCAACCT
NCTC9097	C	G A C G CAA C		AGGTAC ACA CA A C			AGG GGACTGCAAGCT	

	570	580	590	600	610	620	630
UPEC-46	ATGCTCTGACTCCAGCACTGGCTTCCACCGCTTGTAGCCAGAACGAAAAACACCATCACCCTTCCTGCTGAAATAA						
2-005-03_S4_C1	G C G TGAA G AG C GAA CAGG ACC A G A						
2-011-08_S3_C1	A G T C G T A GG T AG A TC A T ACC T AA G						
2-011-08_S3_C2	G C G TGAA G AG C GAA CAGG ACC A G A						
2-011-08_S3_C3	A G T C G T A GG T AG A TC A T ACC T AA G						
2-316-03_S4_C2		G GA AT G					
2-460-02_S3_C1	G C G T A C ATA AG ACC CAA G T						
2-460-02_S3_C2	G C G T A C ATA AG ACC CAA G T						
2-474-04_S3_C1	G C G TGAA G AG C GAA CAGG ACC A G A						
2-474-04_S3_C2	G C G TGAA G AG C GAA CAGG ACC A G A						
2-474-04_S3_C3	G C G TGAA G AG C GAA CAGG ACC A G A						
3-073-06_S3_C2	G C G TGAA G AG C GAA CAGG ACC A G A						
7-233-03_S3_C1	A G T C G T A GG T AG A TC A T ACC T AA G						
7-233-03_S3_C3	A G T C G T A GG T AG A TC A T ACC T AA G						
12-05829	CG C G T A AGCAA AAACAGG CCC CAA G						
381-3		AA GAA A AG C T					
401368	G C T GT T A G C AAA A ACC AG G T						
AM22-15AC							
AM34-8	A A AA G A						
CS01	G C G TGAT G GTAAG CA A G ACC G A						
DEC6C	G C G T ATA AG ACC GAA G						
ECM-1	C G TGAT G AA TC A AGC ACC A G A						
MRE600	G C G TGAA G CAC AA CAGG ACC A G A						
NCTC9035	CG C G T A GG AAA GATA AG ACC GAA G						
NCTC9062	G C G TGAT G A C AA CAGG ACC A G A						
NCTC9097	G C G TGAT G AG C CAA CAGG ACC A G A						

Alinhamento da sequência de nucleotídeos correspondentes ao gene *afpA* da cepa UPEC-46 e das outras 25 cepas AFP⁺. Os diferentes nucleotídeos estão representados em diferentes cores. Os pontos coloridos correspondem a nucleotídeos semelhantes à cepa UPEC-46 e os retângulos tracejados indicam as deleções. Os alinhamentos foram realizados com o auxílio do programa *BioEdit*.

APÊNDICE F – Alinhamento da sequência de aminoácidos para o gene *afpA* de diferentes cepas AFP⁺

	10	20	30	40	50	60	70	80
UPEC-46	MNIFTKKVF	DKKAQKRKSSLLFQKGLSLIE	EASMLALS	AI	VVSGVMYYYQSASD	NNKTQSTVSE	VMSIVSAV	NGLIVGTS
2-005-03_S4_C1		P			A		I	
2-011-08_S3_C1					A		F	A
2-011-08_S3_C2		P			A		I	
2-011-08_S3_C3					A		F	A
2-316-03_S4_C2					A		I	
2-460-02_S3_C1	A	P			A	T		I
2-460-02_S3_C2	A	P			A	T		I
2-474-04_S3_C1		P			A		I	
2-474-04_S3_C2		P			A		I	
2-474-04_S3_C3		P			A		I	
3-073-06_S3_C2		P			A		I	
7-233-03_S3_C1					A		F	A
7-233-03_S3_C3					A		F	A
12-05829		P			A	T	I	I
381-3					A			
401368		P			A			
AM22-15AC					A			
AM34-8					A			
CS01	S							
DEC6C	A	P			A	T		I
ECM-1		P			A		I	
MRE600		P			A		I	
NCTC9035		P			A	T	I	I
NCTC9062		P			A		I	
NCTC9097		P			A		I	

	90	100	110	120	130	140	150	160												
UPEC-46	GYEGLNESVILK	TSSVPE	NYKSKDK	KTIMHPFGGNL	LALGPTQGYTGY	YIELTKIPKSAC	VNLSMMNFGT	SLGGVGVNAPK												
2-005-03_S4_C1	K	A	MN	AI	--N	TQ	T	EIKI	G	KVD	K	V	KDV	QG	A	A	A	GKDV		
2-011-08_S3_C1	D	A	TAKT	ID	AI	D	--K	TQ		EVN	QV	NKGG	--V	NDV	GP	A		H	GVDY	
2-011-08_S3_C2	K	A	MN	AI	--N	TQ	T	EIKI	G	KVD	K	V	KDV	QG	A	A	A	GKDV		
2-011-08_S3_C3	D	A	TAKT	ID	AI	D	--K	TQ		EVN	QV	NKGG	--V	NDV	GP	A		H	GVDY	
2-316-03_S4_C2	A		I		TN	--		S	T		N			AN					TKP	
2-460-02_S3_C1	T	QK	YN	A	G	NNNE		QIDI	A	TDG	K	V	NDV	QGP	A	A	A	GVNA		
2-460-02_S3_C2	T	QK	YN	A	G	NNNE		QIDI	A	TDG	K	V	NDV	QGP	A	A	A	GVNA		
2-474-04_S3_C1	K	A	MN	AI	--N	TQ	T	EIKI	G	KVD	K	V	KDV	QG	A	A	A	GKDV		
2-474-04_S3_C2	K	A	MN	AI	--N	TQ	T	EIKI	G	KVD	K	V	KDV	QG	A	A	A	GKDV		
2-474-04_S3_C3	K	A	MN	AI	--N	TQ	T	EIKI	G	KVD	K	V	KDV	QG	A	A	A	GKDV		
3-073-06_S3_C2	K	A	MN	AI	--N	TQ	T	EIKI	G	KVD	K	V	KDV	QG	A	A	A	GKDV		
7-233-03_S3_C1	D	A	TAKT	ID	AI	D	--K	TQ		EVN	QV	NKGG	--V	NDV	GP	A		H	GVDY	
7-233-03_S3_C3	D	A	TAKT	ID	AI	D	--K	TQ		EVN	QV	NKGG	--V	NDV	GP	A		H	GVDY	
12-05829	KD	YN	A	G	SSNK			EINIKA	TDDAK	V	NNV	QGP	A	A	A	GTAA				
381-3	A	S	A		T			S	T	T	NE	K	AN			SG				
401368	A	KD	MN	AI	A	--	NN	T	TIE	A	NDKAK	V	NEV	QG	A	L	A	EVNA		
AM22-15AC		F						N								Q				
AM34-8	A							T	T	K	D	A	Q			NAQ				
CS01																				
DEC6C	T	YN	A	G	NNNE			QIDI	A	TDG	K	V	NDV	QGP	A	A	A	GVNA		
ECM-1	N	KT	MN	AI	D	K	TK	T	EIEI	A	A	N	K	V	KDV	QG	A	A	G	DV
MRE600	T	T	A	MN	AI	--	K	I	EIKI	A	NVD	K	V	KDV	QG	A	A	A	G	NDV
NCTC9035	K	DG	YN	A	G	V	NK		EIDI	T	AD	AK	V	KNV	QGP	A	A	A	GTAA	
NCTC9062	K	DKT	MN	AI	D	N	TK	T	EIEI	A	NVN	K	V	KDV	QG	A	A	A	G	NNV
NCTC9097	K	A	MN	AI	D	N	TK	T	EIKI	E	NVD	K	V	KDV	QG	A	A	A	G	KNV

APÊNDICE G – Visão geral dos fatores de virulência usados para a criação do *heat map*

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Adesão/invasão	Aap	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Adesão/invasão	AatA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	AatB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	AatC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	AatD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	AatP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	CsgA	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	CsgB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	CsgC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	CsgD	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	CsgE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	CsgF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	CsgG	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	IbeB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	IbeC	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	Iha	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	Nlpl	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	OmpA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adesão/invasão	Tia	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adesão/invasão	TraJ	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	AafA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AafB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AafC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AafD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AfaA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AfaB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AfaC-VIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Fímbria CU	AfaD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AfaE-VIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AfaF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AfaG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	Agg3A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	Agg3B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	Agg3C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	Agg3D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AggA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AggB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AggC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	AggD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	FimA	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	FimB	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	FimC	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	FimD	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	FimE	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	FimF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	FimG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	FimH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	FimI	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	GltF	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	HtrE	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	LpfA	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	LpfA1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	LpfB	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	LpfB1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	LpfC	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Fímbria CU	LpfC1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	LpfD	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	LpfD1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	LpfE1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapGIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	PapX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	SfmA	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	SfmC	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	SfmD	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	SfmF	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	SfmH	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	SfmZ	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	EcpE	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	EcpD	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	EcpC	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	EcpB	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	EcpA	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	YcbF	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Fímbria CU	YcbQ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YcbR	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YcbQ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YcbR	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YcbS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YcbT	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Fímbria CU	YcbU	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YcbV	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YdeQ	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YdeR	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YdeS	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YehA	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YehB	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YehC	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fímbria CU	YehD	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	ChuA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	ChuS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	ChuT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	ChuU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	ChuV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	ChuW	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	ChuX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	ChuY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	CirA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	EfeB	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	EfeO	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	EfeU	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	EntA	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Sistema aquisição ferro	EntB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
Sistema aquisição ferro	EntC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	EntD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	EntE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	EntF	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	EntS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	FbpA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FbpB	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FbpC	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FecA	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FecB	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FecC	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FecD	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FecE	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FecI	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FecR	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
Sistema aquisição ferro	FeoA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	FeoB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	FeoC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	FepA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	FepB	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	FepC	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	FepD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	FepE	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	FepG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sistema aquisição ferro	Fes	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	
Sistema aquisição ferro	FhuA	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Sistema aquisição ferro	FhuB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	FhuC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	FhuD	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	FhuE	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	FhuF	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	Fiu	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	FyuA	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	IreA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	IroB	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	Irp1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	Irp2	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	lucA	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	lucB	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	lucC	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	lucD	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	lutA	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	ShiF	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	SitA	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	SitB	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	SitC	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	SitD	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema aquisição ferro	YbtA	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	YbtE	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	YbtP	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	YbtQ	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	YbtS	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sistema aquisição ferro	YbtT	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Sistema aquisição ferro	YbtU	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Sistema aquisição ferro	YbtX	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resistência Sérica	Bor	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resistência Sérica	Etk	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resistência Sérica	Etp	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resistência Sérica	GfcA	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resistência Sérica	GfcB	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resistência Sérica	GfcC	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resistência Sérica	GfcD	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resistência Sérica	GfcE	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resistência Sérica	KpsC'-K5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	KpsD-II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	KpsE-II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	KpsF-II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	KpsM-II-K5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	KpsS-II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	KpsT-II-K5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	KpsU-II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	OmpP	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	OmpTc	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	OmpTp	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistência Sérica	TraT	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
SST2	GspA	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspB	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspC	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspD	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspE	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspF	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
SST2	GspG	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspH	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspI	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspJ	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspK	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspL	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspM	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST2	GspO	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST3	EC142_3146	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EC142_3147	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EC142_3148	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EC142_3151	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST3	EC142_3152	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST3	EC142_3174	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST3	EC142_3175	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST3	EivH	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EivI	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST3	EivJ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST3	EpaO	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EpaP	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EpaQ	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EpaR	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EprH	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EprI	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EprJ	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST3	EprK	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SST6	AaiA	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiB	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
SST6	AaiC/Hcp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	AaiD	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiE	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiF	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiH	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiI	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiJ	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiK	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiM	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiN	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiS	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	AaiT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
SST6	AaiU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	AaiW	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
SST6	EC142_4524	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4525	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4526	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4527	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4528	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4529	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4531	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4533	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4534	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4535	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4536	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4537	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4538	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4539	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	
SST6	EC142_4541	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SST6	EC142_4541	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4542	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4543	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EC142_4544	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	ECP_2811/TssC	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	ECP_2815/TssD	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	ECP_2816/TssH	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	ECP_2818/TssF	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsA	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsB	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsC	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsD	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsG	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsH	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsI	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsM	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsN	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsR	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsS	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsU	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsV	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST6	EtsX	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4P	AfpA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpA2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
T4P	AfpE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpJ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpK	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4P	AfpR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
T4P	AfpU	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST5	AatA	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	AidA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Cah	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
SST5	EaaA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EatA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EhaA	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EhaB	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EhaC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
SST5	EhaD	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EhaG	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EhaJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EibA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EibC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EibD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EibE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EibF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EibG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
SST5	EpeA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EspC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Espl	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
SST5	EspP	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EtpA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	EtpB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Flu_1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Flu_2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	IcsA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Pet	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Pic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Saa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Sat	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	SepA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	TibA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Tsh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	UpaB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	UpaC	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST5	UpaG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	UpaH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	UpaI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SST5	UpaJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SST5	Vat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	AstA	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Toxinas	Cfa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Cta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	E-HlyA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	E-HlyB	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Toxinas	E-HlyD	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	HlyA	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	HlyB	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	HlyC	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	HlyD	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	HlyE/ClyA	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Toxinas	StcE	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Stx1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Stx2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Cnf1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Cnf2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Cnf3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Cba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Cmi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Csa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxinas	Usp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	FlgA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgF	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgJ	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgK	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FlgL	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1

(continua)

(continuação)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Flagelo	FlgN	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Flagelo	FliB	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	FliC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Flagelo	FliD	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	FliE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Flagelo	FliA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliD	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliE	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliF	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliG	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliH	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliI	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliJ	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliK	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliL	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliM	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliN	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliO	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliP	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliQ	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliR	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliS	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliT	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliZ	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Flagelo	FliK	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flagelo	LafA	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continua)

(conclusão)

Classe	Fator de virulência	Cepas																									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Flagelo	LafB	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafC	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafD	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafE	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafF	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafK	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafS	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafT	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafU	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafV	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flagelo	LafW	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela com os fatores de virulência utilizados para a criação do *heat map* (Figura 22). Foram pesquisados 398 fatores de virulência nos genomas da cepa UPEC-46 e das 25 cepas AFP⁺. A presença ou ausência dos fatores de virulência se deu por meio da análise da sequência de aminoácidos pelo programa *BLASTP*⁺, sendo considerados como positivos fatores de virulência com valores mínimos de 1×10^{-10} de ponto de corte para o valor E (*-evaluate 1e-10*), 70% de ponto de corte para a identidade e cobertura. Os números ('1') e ('0') definem a presença e ausência do fator de virulência, respectivamente. As classes e os fatores de virulência estão indicados na ordem como aparecem no *heat map*. Os nomes das cepas estão representados em ordem alfabética (A-Z), para facilitar a visualização da tabela, e estão ordenados de acordo com a posição na árvore filogenética da Figura 21 e 22.

Nome das cepas de *E. coli*: **A**, NCTC9097; **B**, 12-05829; **C**, MRE600; **D**, AM22-15AC; **E**, CS01; **F**, ECM-1; **G**, AM34-8; **H**, 2-316-03_S4_C2; **I**, NCTC9062; **J**, NCTC9035; **K**, 401368; **L**, UPEC-46; **M**, DEC6C; **N**, 2-460-02_S3_C1; **O**, 2-460-02_S3_C2; **P**, 381-3; **Q**, 2-011-08_S3_C3; **R**, 2-011-08_S3_C1; **S**, 7-233-03_S3_C1; **T**, 7-233-03_S3_C3; **U**, 3-073-06_S3_C2; **V**, 2-474-04_S3_C2; **W**, 2-474-04_S3_C3; **X**, 2-005-03_S4_C1; **Y**, 2-474-04_S3_C1; **Z**, 2-011-08_S3_C2.

CU, *chaperona-usher*; SST2, sistema de secreção do tipo II; SST3, sistema de secreção do tipo III; SST5, sistema de secreção do tipo V; SST6, sistema de secreção do tipo VI; T4P, *pilus* tipo IV.