



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULA SIGNOLFI CYOIA

**DETERMINAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA, ILHAS DE
PATOGENICIDADE E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA
EXTRAIESTINAL ISOLADAS DE HUMANOS**

PAULA SIGNOLFI CYOIA

**DETERMINAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA, ILHAS DE
PATOGENICIDADE E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA
EXTRAINTESTINAL ISOLADAS DE HUMANOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C996d Cyoia, Paula Signolfi.

Determinação de genes de virulência, ilhas de patogenicidade e análise filogenética de amostras de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal isoladas de humanos / Paula Signolfi Cyoia. – Londrina, 2014.
48 f. : il.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* – Genética – Teses. 2. Virulência (Microbiologia) – Teses. 3. Filogenia – Teses. 4. Microbiologia – Teses. I. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 576.851.48

PAULA SIGNOLFI CYOIA

**DETERMINAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA, ILHAS DE
PATOGENICIDADE E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE
Escherichia coli PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL ISOLADAS DE
HUMANOS**


Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina - UEL



Prof^a Dr^a Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Orientadora
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 4 de abril de 2014.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

(Dalai Lama)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação, tanto pessoal quanto acadêmica. Em especial, agradeço aqueles que estavam mais envolvidos no desenvolvimento deste trabalho:

Em especial à Profa. Dra. Renata K. T. Kobayashi pela orientação, dedicação e amizade. Mesmo estando um ano longe do laboratório, ainda conseguiu estar presente em todos os momentos. Foram muitos e-mails e mensagens. Não posso falar que foi fácil, porém foi uma experiência muito construtiva. Obrigada pelas vezes que me incentivou, me deu conselhos e esperanças, com seu jeito calmo e afetuoso. Obrigada por ter confiado em mim e por ser uma orientadora e uma pessoa tão querida.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato pela coorientação, por ajudar a realizar os experimentos e também confiar no meu trabalho. Por representar, e muito bem, o papel da Renata quando ela estava fazendo seu pós-doutorado. Obrigada por sempre estar por perto quando precisei tirar dúvidas e por ajudar nas correções dos meus trabalhos assim como na banca de qualificação.

À Profa. Dra. Eliane Vespero e a Ana Paula Dier, por me ajudarem com as coletas no Hospital Universitário para início dos meus experimentos. Obrigada pela agilidade e dedicação.

Aos colegas do Laboratório NIP 3, que durante esses anos estiveram presentes ajudando na execução do meu trabalho. Obrigada pelo companheirismo, amizade e principalmente pela paciência para me escutar falar sem parar e as vezes até cantar lindas músicas para vocês.

Aos meus pais, Akio e Cleide, e à minha irmã Flávia por me incentivarem a estudar, não desanimar e levar a frente essa área acadêmica, sempre me dando suporte, conselhos e muito carinho.

Agradeço ao meu noivo, Willians L. L. Rodrigues, por também estar comigo durante essa fase do mestrado me escutando, ajudando e apoiando com tanto amor.

Obrigada a todos por estarem presentes em todos os momentos!

CYOIA, Paula Signolfi. **Determinação de genes de Virulência, Ilhas de Patogenicidade e Análise Filogenética de amostras de *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal Isoladas de Humanos**. 2014. 48f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2014.

RESUMO

Escherichia coli Patogênica Extraintestinal (ExPEC) são amplamente estudadas pois, podem ser associadas com vários agentes patogênicos, tais como infecções do trato urinário, meningite neonatal e sepse. Há muitos fatores de virulência (FV) encontrados em ExPEC tais como *papC*, *papG*, *ecpA*, *iroN*, *fyuA*, *iutA*, *ompT*, *tsh*, *hlyF*, *hlyA* e *iss*. Esses fatores podem estar presentes em ilhas de patogenicidade (PAI), que podem codificar vários outros FV. De acordo com a classificação filogenética de Clermont, *E. coli* podem pertencer aos principais grupos A, B1, B2 e D. As bactérias comensais pertencem principalmente ao grupo A e ExPEC distribuem-se mais no grupo B2. Neste estudo, foi analisada a presença de FV, PAI e grupos filogenéticos de 96 amostras de *E. coli* isoladas de urina e sangue de pacientes do Hospital Universitário de Londrina, e estas amostras foram comparadas com 50 amostras comensais. Destacou-se o FV *fyuA* (65,60%) em amostras patogênicas e *hlyA* (54%) em amostras comensais. A comparação da distribuição de ExPEC e amostras comensais nos grupos filogenéticos mostraram que no grupo B2 tivemos mais ExPEC; por outro lado, o grupo A tinha mais amostras comensais. A distribuição das sete PAIs entre as amostras comensais e ExPEC mostrou que a PAI IV₅₃₆ (44% e 67,7%) foi a mais encontrada em ambos os locais. Estes resultados mostraram que tanto a caracterização filogenética, a busca de fatores de virulência e a pesquisa de PAI contribuem na análise da patogenicidade das bactérias que causam infecções, auxiliando na compreensão da sua patogênese.

Palavras-chave: ExPEC. Grupo filogenético. Fatores de virulência. PAI.

CYOIA, Paula Signolfi. **Determination of virulence genes, pathogenicity islands and phylogenetic analysis of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human**. 2014. 48p. Dissertation (Microbiology Master) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2014.

ABSTRACT

Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) are widely studied because they can be associated with various pathogens such as urinary tract infections, neonatal meningitis and septicemia. There are many virulence factors (VF) found in ExPEC which are *papC*, *papG*, *ecpA*, *iroN*, *fyuA*, *iutA*, *ompT*, *tsh*, *hlyF*, *hlyA* and *iss*. They may be present in pathogenicity islands (PAI), which can encode several others VF. According to the phylogenetic classification, *E. coli* belong to the main groups A, B1, B2 or D, whereas commensal bacteria belong mainly to group A and ExPEC distribute themselves more in group B2. In this study, we analyzed the presence of VF, PAIs and phylogenetic groups of 96 ExPEC strains isolated from urine and blood of patients on the University Hospital of Londrina, and we compared with 50 commensal strains. In this study, we highlight the VF *fyuA* (65.60%) in pathogenic samples and *hlyA* (54%) in commensal samples. A comparison of the distribution of ExPEC and commensal strains in the phylogenetic groups showed that in the group B2 we had more ExPEC; on the other hand, group A had more commensal samples. The distribution of the seven PAIs between commensal strains and ExPEC strains showed that PAI IV₅₃₆ (44% and 67.7%) was the most found in both sites. These results showed that both phylogenetic characterization, the search for virulence factors and PAIs research contribute in the analysis of the pathogenicity of the bacteria that cause infections, aiding in the understanding of their pathogenesis.

Keywords: ExPEC. Phylogenetic group. Virulence factors. PAI.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	8
1.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> EXTRAINTESTINAL (EXPEC).....	8
1.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	10
1.3.1	Aquisição de ferro.....	11
1.3.2	Protease e toxina.....	12
1.3.3	Sobrevivência bacteriana.....	13
1.3.4	Adesinas.....	14
1.4	ILHAS DE PATOGENICIDADE (PAI).....	15
1.5	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	16
1.6	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	17
2	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	18
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	ARTIGO CIENTÍFICO	25
5	CONCLUSÕES	46
	ANEXO	47
	ANEXO A.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é uma bactéria que faz parte da família Enterobacteriaceae e pode ser caracterizada como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos móveis ou imóveis, com presença de adesinas fimbriais e/ou afimbriais, responsáveis pela adesão da bactéria. Está presente na microbiota intestinal humana, bem como em outros animais de sangue quente como bovinos, aves e equinos (PITOUT, 2012). Esta bactéria pode ser classificada em diferentes grupos de acordo com o local da infecção e da linhagem patogênica. Nos animais, podem acarretar quadros gastroentéricos e grande variedade de outras infecções, incluindo mastite, endometrite, cistite, nefrite, artrite, abortamento, osteomielite, endocardite, pneumonia, conjuntivite, septicemia, entre outros (LLOYD et al., 2007). No homem, existem amostras comensais, pertencentes à microbiota normal; amostras associadas às infecções intestinais (DEC – *E. coli* Diarreiogênica), representadas por *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Produtora de toxina shiga (STEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) (ESTRADA-GARCIA et al., 2009, KÖHLER; DOBRINDT, 2011) e outras associados com infecções extraintestinais (ExPEC – *E. coli* Patogênica Extraintestinal) (MORIEL et al., 2010).

1.2 *E. COLI* PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL (EXPEC)

Dentre os patótipos de *E. coli*, ExPEC são os principais agentes etiológicos das bacteremias causadas por bacilos Gram-negativos, tanto em infecções de origem comunitária quanto as de origem hospitalar (BIENDENBACH et al., 2004; PITOUT, 2012; SADER et al., 2001). São amplamente estudadas visto que podem estar associadas a diversas patogenias extraintestinais como infecções no trato respiratório, urinário (UPEC), meningite bacteriana neonatal (NMEC), sepsis, osteomielites, celulites, infecções de feridas, infecções intra-abdominais diversas e pneumonias hospitalares (JOHNSON; RUSSO, 2002a, 2002b; RUSSO; JOHNSON, 2000; WIESER et al., 2010). Estas infecções podem desenvolver-se tanto em

animais (como a patogênica para aves – APEC) como em humanos sugerindo, portanto, um risco zoonótico (JOHNSON et al., 2009). Tem sido relatado que ExPEC difere de *E. coli* comensais especialmente por pertencerem a grupos filogenéticos distintos e apresentarem diferentes fatores de virulência (JOHNSON et al., 2001). A presença de alguns fatores de virulência nas bactérias está relacionada com a capacidade que elas têm de sobreviver em quase todos os sítios anatômicos, e, dessa forma, evadir-se do sistema imune do hospedeiro, invadir tecidos e induzir resposta inflamatória, causando as infecções extraintestinais (JOHNSON; RUSSO, 2005).

As infecções do trato urinário (ITU) são consideradas uma das mais comuns encontradas na população em geral no mundo todo (LOPES; TAVARES, 2005). O agente etiológico mais comumente isolado das ITUs é a bactéria *E. coli*, responsável por aproximadamente 70-85% das infecções urinárias dos pacientes (RORIZ-FILHO et al., 2010).

Tem sido extensivamente pesquisada uma correlação entre ExPEC humana, principalmente UPEC, e APEC. APEC é responsável pela colibacilose aviária, que se refere a qualquer infecção localizada ou sistêmica, tais como uma septicemia aguda ou subaguda fatal, pericardite ou aerossaculite (CAMPOS et al., 2008; DOZOIS et al., 2000). É responsável por grandes perdas financeiras para a indústria avícola devido à mortalidade, perda de produção e condenações das carcaças (ZHAO et al., 2009). ExPEC humana e APEC apresentam similaridades nos sorogrupos e nos genes de virulência (BONACORSI et al., 2000; BULLEN et al., 2005; OELSCHLAEGER et al., 2002). A presença comum de um conjunto de genes associados à virulência entre linhagens de APEC e UPEC, bem como os semelhantes padrões filogenéticos da doença, indica uma relação genética entre isolados de APEC e UPEC (KAPER et al., 2004; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2006; RON, 2006). Skyberg et al. (2006) sugeriram que plasmídios de APEC serviriam como reservatórios de genes associados à urovirulência para amostras de UPEC, uma vez que, uma amostra comensal que recebeu plasmídios de APEC tornou-se capaz de crescer na urina humana e colonizar rins de camundongos.

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência incluem mecanismos que contribuem para a instalação do patógeno no tecido hospedeiro, subvertendo as barreiras de defesa do sistema imune sendo que os genes responsáveis pela codificação destes fatores podem estar em cromossomos, fagos ou plasmídios (DONNENBERG; WHITTAM, 2001; JOHNSON; STELL, 2000; MUHLDORFER; HACKER, 1994). Por apresentar estas características especiais, podem colonizar diferentes sítios extraintestinais, sobreviver em ambientes com baixa concentração de ferro, escapar do sistema imune do hospedeiro, resistir às células de defesa e à atividade lítica do soro, invadir tecidos, além de produzir substâncias citotóxicas como hemolisinas e fator necrotizante citotóxico 1, e então causar uma infecção extraintestinal (JOHNSON; RUSSO, 2002a; RUSSO; JOHNSON, 2003).

Vários genes de virulência tem sido identificados em ExPEC, entre eles o *papC* (fímbria P), *papG* (fímbria P), *ecpA* (fímbria adesiva extracelular), *iroN* (relacionado à síntese de receptores de sideróforo salmoquelina), *fyuA* (receptor de yersiniabactina), *iutA* (relacionado à síntese de receptores de sideróforo aerobactina), *ompT* (codifica a produção de proteína de membrana externa), *tsh* (hemaglutinina temperatura sensível), *hlyF* e *hlyA* (responsáveis pela produção de hemolisina) e *iss* (confere resistência sérica à bactéria) (BÉLANGER et al., 2011; EWERS et al., 2009; JOHNSON et al., 2008a; SANTOS et al., 2009). Estes fatores são comumente encontrados em isolados de ExPEC conferindo a estas amostras um potencial patogênico que é incomum em amostras comensais (SABATÉ et al., 2006).

Além disto, recentemente, tem sido relatada uma nova região plasmídica chamada *Conserved Virulence Plasmidic* (CVP) que apresenta 8 operons ou genes: *iro*, *iuc*, *sit*, *ompT*, *cva*, *hlyF*, *ets* e *iss* (LEMAÎTRE et al., 2013). Esta região está presente em cerca de 10-20% das amostras de infecção urinária e 50-60% das amostras de meningite neonatal, e classificada principalmente como do grupo filogenético B2 (JOHNSON et al., 2008b; MAHJOUR-MESSAI et al., 2011; PEIGNE et al., 2009).

1.3.1 Aquisição de Ferro

A concentração de ferro é limitada em locais de infecção extraintestinal em grande parte devido a fatores do hospedeiro que reduzem a sua disponibilidade. O ferro é elemento essencial para a multiplicação bacteriana. No entanto, a disponibilidade desse íon é limitada, encontrado intracelularmente nas proteínas heme e em pequena quantidade no meio extracelular (ANDREWS et al., 2003; RUSSO et al., 2002). Conseqüentemente como resultado, a aquisição de ferro é uma necessidade crítica de patógenos que se multiplicam dentro de um hospedeiro (RUSSO et al., 2002). As bactérias patogênicas desenvolvem diversos mecanismos envolvidos na aquisição de ferro para superar seu déficit, como a síntese de sideróforos, que são quelantes de ferro e sistemas de captação de ferro de moléculas como heme, transferrina e lactoferrina (CROSA et al., 2004; ANDREWS et al., 2003). A perda desses sistemas em bactérias patogênicas diminui acentuadamente sua virulência demonstrando a correlação entre aquisição de ferro e doenças infecciosas bacterianas. Fatores que envolvem a aquisição de ferro possuem uma alta prevalência em isolados de ExPEC (BÉLANGER et al., 2011).

A salmoquelina e a aerobactina são sideróforos produzidos em condições de baixa disponibilidade de ferro nos fluidos corpóreos e nos tecidos de vertebrados e tem como função capturar ferro da transferrina (CAZA et al., 2011; TORRES et al., 2001). Além desses dois fatores de virulência, também pode ser encontrado a yersiniabactina, originalmente encontrado em *Yersinia* spp., que também está relacionada com a captação de ferro (JOHNSON; RUSSO, 2005).

Os genes que codificam a aerobactina podem estar localizados tanto em plasmídios como no cromossomo bacteriano. Este operon é composto por cinco genes *iucABCD* e *iutA*, dos quais quatro (*iucABCD*) codificam enzimas necessárias para a síntese da aerobactina e o *iutA*, receptor de aerobactina. Este sideróforo é encontrado facilmente em humanos com pielonefrite (73%), cistite (49%) ou bacteremia (58%) e, também podem ser encontradas, em pacientes com bacteriúria assintomática (38%) ou em amostras fecais (41%), denotando a maior participação deste fator de virulência nas infecções extraintestinais, particularmente no trato urinário (GARCIA; LE BOUGUENEC, 1996).

O gene *iro* está localizado no plasmídio ColV e é codificado pelos genes *iroBCDEN*. Foi demonstrado que a expressão gênica de *iroN* é regulada de

acordo com a concentração de ferro presente no meio e aumentada na presença de urina humana, fluido ascítico ou sangue, de acordo com a origem dos isolados de *E. coli* utilizados (SORSA et al., 2003).

1.3.2 Protease e Toxinas

Entre as proteínas identificadas em *E. coli* a endoprotease OmpT, hemaglutinina tsh e a alfa-hemolisina. A proteína ompT está localizada na membrana externa que originalmente foi classificada como uma protease serina, e atualmente como uma protease aspartil (família A26). A enzima consiste de 297 resíduos de aminoácidos e apresenta poucas cisteínas, e requer o lipopolissacarídeo da membrana externa para a sua atividade.

O gene *ompT*, codifica proteínas localizadas na membrana externa e tem sido caracterizado como um ativador do plasminogênio, com a capacidade de hidrolisar a protamina e bloquear a sua entrada. As proteínas por ele produzidas ajudam na permanência da *E. coli* no trato urinário, prolongando a infecção (VANDEPUTTE-RUTTEN et al., 2001). Em um trabalho realizado por Zhao et al. (2009), foi encontrado mais de 60% de positividade do gene *ompT* nas amostras de UPEC.

A hemaglutinina Tsh, codificada pelo gene *tsh*, foi isolada e caracterizada pela primeira vez em amostra de APEC que causavam aerosaculite e colisepticemia em aves (DOZOIS et al., 2000; PROVENCE; CURTISS, 1992). Esta apresenta atividade proteolítica em adição à atividade de hemaglutinação. No entanto, seu papel em ExPEC tem sido questionado por alguns autores. Rodriguez-Siek et al. (2005), comparando os fatores de virulência presentes em APEC e UPEC, encontraram o gene *tsh* em 63% de APEC e 39,5% de UPEC. Por outro lado, Heimer et al. (2004), analisando amostras humanas encontraram o gene *tsh* em 63% de UPEC e em 33% de *E. coli* isolada de fezes. Esses dados sugerem que o gene *tsh* faz parte do conjunto de genes de virulência presentes em ExPEC.

As linhagens hemolíticas predominam em infecções extraintestinais, tais como ITU, peritonite, apendicite, sepsis e meningite neonatal. A hemolisina, conhecida também como proteína formadora de poros na membrana de células, possui capacidade de lisar eritrócitos, leucócitos, granulócitos, fibroblastos e células uropiteliais. A lise de eritrócitos aumenta a disponibilidade do íon ferro para o

microrganismo, e ocorre frente a altas concentrações da alfa hemolisina. Esta proteína, em baixas concentrações, é lítica para leucócitos, monócitos e linfócitos T periféricos. A síntese, a maturação e a secreção da alfa hemolisina são determinadas pelo operon *hlyCABD*, que codifica as proteínas HlyA, HlyB, HlyC e HlyD, as quais estão envolvidas na lise das células (ISLAND et al., 1998).

O gene *hlyA* tem sido frequentemente associado ao grupo filogenético B2 de amostras de UPEC. Trabalhos como os de Zhao et al. (2009) e Piatti et al., (2008), mostraram uma frequência de 34% e 10% respectivamente, sendo que o último encontrou um número menor de amostras relacionadas a este grupo filogenético.

O gene *hlyF* é frequentemente encontrado em amostras de APEC por ser uma hemolisina aviária, e também já foi encontrada em amostra NMEC (PEIGNE et al., 2009). Estudos como o de Skyberg et al. (2008), mostram uma alta expressão da *hlyF* nas amostras de *E. coli*, quando comparado a outros genes: *iroN*, *iutA*, *cvaC* e *tsh*.

1.3.3 Sobrevivência Bacteriana

Mecanismo de resistência ao soro é compreendido como a capacidade que determinado microrganismo apresenta em evadir-se do sistema imunológico do hospedeiro. Essa capacidade é devida a alguns fatores como à presença de antígenos capsulares, lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa denominadas Iss, codificada pelo gene *iss*.

O gene *iss* foi descrito pela primeira vez em *E. coli* humana associado com o plasmídeo ColV pela sua capacidade de conferir resistência sérica. Este gene é responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema do complemento que atua na membrana celular causando a lise da célula. Portanto, ele confere à bactéria resistência ao complemento, que é um mecanismo de defesa do hospedeiro e que atua contra infecções, pois é capaz de promover a opsonização e lise do agente infeccioso (BINNS et al., 1982). Essa característica é importante para a patogênese uma vez que auxilia a bactéria a persistir nos fluidos e órgãos internos do hospedeiro (MELLATA et al., 2003).

O gene *iss* está localizado em um plasmídeo conjugativo R, com um tamanho aproximado de 100 kb, juntamente com outros genes de virulência e de

resistência a antimicrobianos. Este plasmídeo pode ser transferido, por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive outras *E. coli*. Quando isto ocorre, a bactéria que o recebeu adquire a capacidade de produzir aerobactina, resistência à ampicilina, à tetraciclina e ao complemento (JOHNSON et al., 2004; JOHNSON et al., 2002).

1.3.4 Adesinas

A colonização dos tecidos do hospedeiro por agentes patogênicos bacterianos é multifatorial envolvendo adesinas fimbriais e não fimbriais, que podem atuar ao mesmo tempo ou em diferentes estágios durante a infecção (RENDÓN et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009). Os pili são fatores de virulência que medeiam a agregação e o reconhecimento específico do receptor da célula hospedeira.

A *E. coli* pilus comum (ECP), é uma fimbria adesiva extracelular codificada pelo operon *ecpRABCDE*. Foi primeiramente documentada em associação com amostras de meningite neonatal e sepsis, onde foi originalmente chamada de fimbria Mat (meningite associada e com temperatura regulada) (GARNETT et al., 2012; POUTTU et al., 2001). Novos estudos, no entanto, revelaram que o operon do *ecp* é bastante conservado e distribuído em *E. coli*, tornando-o uma estrutura comum tanto em amostras comensais como em amostras patogênicas (BLACKBURN et al., 2009; GARNETT et al., 2012; SALDAÑA et al., 2009). Além disso, este gene é encontrado em outras enterobactérias patogênicas que se desenvolvem no trato gastrointestinal e urinário (GARNETT et al., 2012).

A fimbria P, que reconhece glicopeptídios contendo especificamente o dissacarídeo α -D-galactose (1-4) β -D-galactose, está envolvida em diferentes infecções extraintestinais (KÄLLENIUS et al., 1980; RUIZ et al., 2002). Foi inicialmente encontrada em amostras de *E. coli* que causam UTI em humanos, e é responsável pela aderência bacteriana às células uroepiteliais, e está envolvida no desenvolvimento de pielonefrite (JOHNSON, 1991; LE BOUGUENEC, 2005). Tem sido encontrada em amostras de ExPEC e em comensais do trato gastrointestinal (BONACORSI; BINGEN, 2005; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005). É codificada pelo operon *pap - pyelonepritis associated adhesin* – que compreende tais genes: *papA* que codifica a subunidade maior do corpo da fimbria; *papE*, *papF* e *papG* que codificam as subunidades menores; *papH* que ajuda na fixação na célula; *papC* e

papD que são responsáveis pela polimerização e transporte dos peptídeos da fimbria.

1.4 ILHAS DE PATOGENICIDADE (PAI)

Os microrganismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie pelo fato de possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, isto é, fatores que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira, ocasionando o aparecimento de sinais e sintomas anormais, que irão, finalmente, definir o estado de doença.

Além dos fatores de virulência já citados, foi descrito em 1990 por Hacker et al., as Ilhas Genômicas (IG) e dentre elas, as Ilhas de Patogenicidade (PAI) que podem carrear vários fatores de virulência, que também podem ser carregados por plasmídios e bacteriófagos lisogênicos, bem como codificar parte ou todo arsenal molecular para que esses fatores capacitem o microrganismo a alcançar o alvo na célula hospedeira.

As PAIs estão localizadas em regiões cromossômicas, segmentos geralmente grandes de DNA, que possuem entre 10 a 200 kb (VIEIRA, 2009). As PAIs são constituídas por guanidina e citosina (G+C) em concentrações diferentes da encontrada no genoma bacteriano do hospedeiro e normalmente estão inseridas em regiões específicas do genoma bacteriano associadas a genes que codificam RNAt (SABATÉ et al., 2006). Entretanto, como o sítio-alvo é duplicado durante a inserção, um gene de RNAt intacto é regenerado durante o processo de inserção. Acredita-se que estas PAIs possuem origem exógena pelos seguintes motivos: estas ilhas são flanqueadas por repetições invertidas, mostrando que em algum momento da evolução, esta região foi inteiramente inserida no cromossomo por transposição; a composição das bases e o uso preferencial de códons diferem de forma relevante do restante do genoma; e por fim, estas não são encontradas em todas as linhagens, apenas em algumas (MADIGAN et al., 2010).

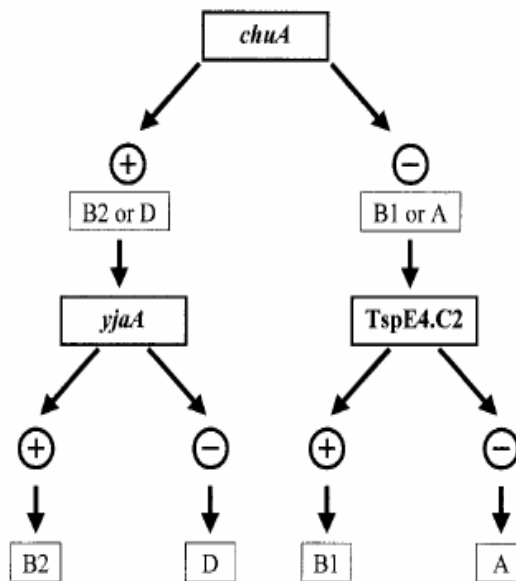
Em *E. coli* uropatogênicas, as PAIs mais estudadas são: PAI I e II identificadas em *E. coli* J96 e *E. coli* CFT073; e PAI I a IV em *E. coli* 536, verificando-se que a PAI IV₅₃₆ é a mais frequente em UPEC (SABATÉ et al., 2006; SCHMIDT; HENSEL, 2004). A presença de PAIs é uma característica presente em amostras de

UPEC associadas com formas clinicamente graves da infecção (GAL-MOR; FINLAY, 2006; KAO et al., 1997).

1.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

E. coli pode ser ainda classificada filogeneticamente pesquisando-se os genes *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TSPE4.C2 (CLERMONT et al., 2000; KOTLOWSKI et al., 2007). De acordo com a presença ou ausência destes genes, classifica-se *E. coli* como pertencentes do grupo B2, grupo D, grupo B1 e grupo A (Figura 1). Um novo grupo foi descoberto recentemente, o grupo C, um subgrupo classificado erroneamente como do grupo A pelo triplex de Clermont, apesar de ser mais correlacionado com o grupo B1 (CLERMONT et al., 2013; LEMAÎTRE et al., 2013). As amostras comensais pertencem principalmente ao grupo filogenético A e B1 (MORENO et al., 2005; TENAILLON et al., 2010); enquanto as patogênicas intestinais distribuem-se pelos grupos B1, D e em menor frequência pelo grupo A (SANTOS et al., 2009); e as ExPEC humanas, incluindo UPEC, NMEC, são representantes do grupo B2 e também, em menor frequência, do grupo D (EWERS et al., 2007). ExPEC difere de amostras de *E. coli* comensais e patogênicas intestinais não só devido a presença de diversos fatores de virulência como adesinas, invasinas, toxinas, sistemas captadores de ferro; mas também por pertencerem, em sua maioria, ao grupo filogenético B2 (JOHNSON et al., 2008b). As amostras de ExPEC que pertencem aos grupos A e B1 geralmente possuem poucos fatores de virulência apresentando portanto, baixa virulência quando comparadas as amostras de ExPEC pertencentes aos grupos filogenéticos B2 e D (EWERS et al., 2007; LEMAÎTRE et al., 2013).

Figura 1 - Representação esquemática da classificação filogenética de *E. coli* baseada nos genes *chuA*, *yjaA* e no fragmento TSPE4C2, segundo Clermont et al. (2000).



1.6 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência às diversas drogas utilizadas na terapêutica das infecções causadas pela *E. coli* tem sido motivo de preocupação das autoridades de saúde. Nos últimos tempos o uso indiscriminado de antimicrobianos tem aumentado a prevalência de bactérias resistentes e conseqüente permuta dos mecanismos de resistência entre bactérias (FOXMAN et al., 2007).

β -lactâmicos, sulfonamidas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos são as drogas antimicrobianas mais comumente prescritas para o tratamento das ITUs (ARSLAN et al., 2005). Contudo, o crescente índice de resistência aos antimicrobianos aliado ao fato de que as amostras de *E. coli* não apresentam um perfil constante de susceptibilidade a estas drogas torna necessária a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos a fim de monitorar os padrões de resistência entre os patógenos causadores de infecções urinárias.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRIGUEZ-QUINONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiol Rev**, v. 27, n. 2-3, p. 215-37, Jun 2003.

ARSLAN, H. et al. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 5, p. 914-8, Nov 2005.

BIEDENBACH, D. J.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 50, n. 1, p. 59-69, Sep 2004.

BÉLANGER, L. et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 62, n. 1, p. 1-10, Jun 2011.

BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV,I-K94. **Infect Immun**, v. 35, n. 2, p. 654-9, Feb 1982.

BLACKBURN, D. et al. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 1781-4, Jun 2009.

BONACORSI, S.; BINGEN, E. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. **Int J Med Microbiol**, v. 295, n. 6-7, p. 373-81, Oct 2005.

BONACORSI, S. P. et al. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infect Immun**, v. 68, n. 4, p. 2096-101, Apr 2000.

BULLEN, J. J. et al. Iron and infection: the heart of the matter. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 325-30, Mar 2005.

CAMPOS, T. A. et al. Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC). **Pesq Vet Bra**. v. 28. p. 533-540, Oct 2008.

CAZA, M.; LÉPINE, F.; DOZOIS, C. M. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 80. p. 266-282, 2011.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 10, p. 4555-8, Oct 2000.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ Microbiol Rep**, v. 5, n. 1, p. 58-65, Feb 2013.

CROSA, J. H.; MEY, A. R.; PAYNE, S. M. Iron transport in bacteria. **ASM Press**, Washington, D.C. 2003.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, v. 107, n. 5, p. 539-48, Mar 2001.

DOZOIS, C. M. et al. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4145-54, Jul 2000.

ESTRADA-GARCIA, T. et al. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 93-8, Jan 2009.

EWERS, C. et al. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 1, p. 184-92, Jan 2009.

_____. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **Int J Med Microbiol**, v. 297, n. 3, p. 163-76, Jun 2007.

FOXMAN, B.; KI, M.; BROWN, P. Antibiotic resistance and pyelonephritis. **Clin Infect Dis**, v. 45, n. 3, p. 281-3, Aug 2007.

GAL-MOR, O.; FINLAY, B. B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 11, p. 1707-19, Nov 2006.

GARCIA, M. I.; LE BOUGUENEC, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrheagenic *Escherichia coli*. **Bull. Inst. Pasteur**, v.94. p. 201-236, 1996.

GARNETT, J. A. et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 10, p. 3950-5, Mar 2012.

HACKER, J. et al. Deletions of chromosomal regions coding for *fimbriae* and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. **Microb Pathog**, v. 8, n. 3, p. 213-25, Mar 1990.

HEIMER, S. R. et al. Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 593-7, Jan 2004.

ISLAND, M. D. et al. Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1-positive and -negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells. **Infect Immun**, v. 66, n. 7, p. 3384-9, Jul 1998.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 4, n. 1, p. 80-128, Jan 1991.

JOHNSON, J. R. et al. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **J Infect Dis**, v. 183, n. 1, p. 78-88, Jan 2001.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". **J Lab Clin Med**, v. 139, n. 3, p. 155-62, Mar 2002a.

_____. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. **J Infect Dis**, v. 186, n. 6, p. 859-64, Sep 2002b.

_____. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Int J Med Microbiol**, v. 295, n. 6-7, p. 383-404, Oct 2005.

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, n. 1, p. 261-72, Jan 2000.

JOHNSON, T. J. et al. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Dis**, v. 46, n. 2, p. 342-52, 2002 Apr-Jun 2002.

_____. Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. **Foodborne Pathog Dis**, v. 6, n. 6, p. 657-67, 2009 Jul-Aug 2009.

JOHNSON, T. J.; SKYBERG, J.; NOLAN, L. K. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. **Avian Dis**, v. 48, n. 2, p. 351-60, 2004 Apr-Jun 2004.

JOHNSON, T. J. et al. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 12, p. 3987-96, Dec 2008.

_____. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 22, p. 7043-50, Nov 2008.

KAO, J. S. et al. Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. **Infect Immun**, v. 65, n. 7, p. 2812-20, Jul 1997.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123-40, Feb 2004.

KOTLOWSKI, R. et al. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 56, n. 5, p. 669-75, May 2007.

KÄLLENIUS, G. et al. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection**, v. 8 Suppl 3, p. 288-93, 1980.

KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 8, p. 642-7, Dec 2011.

LE BOUGUENEC, C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. **Int J Med Microbiol**, v. 295, n. 6-7, p. 471-8, Oct 2005.

LEMAÎTRE, C. et al. A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74423, 2013.

LLOYD, A. L.; RASKO, D. A.; MOBLEY, H. L. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 189, n. 9, p. 3532-46, May 2007.

LOPES, H. V. et al. [Diagnosis of urinary tract infections]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 51, n. 6, p. 306-8, 2005 Nov-Dec 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12^aed, Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAHJOURB-MESSAI, F. et al. *Escherichia coli* isolates causing bacteremia via gut translocation and urinary tract infection in young infants exhibit different virulence genotypes. **J Infect Dis**, v. 203, n. 12, p. 1844-9, Jun 2011.

MELLATA, M. et al. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infect Immun**, v. 71, n. 1, p. 536-40, Jan 2003.

MORENO, E. et al. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 53, n. 2, p. 93-9, Oct 2005.

MORIEL, D. G. et al. Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 20, p. 9072-7, May 2010.

MOULIN-SCHOULEUR, M. et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 10, p. 3484-92, Oct 2006.

MUHLDORFER, I.; HACKER, J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. **Microb Pathog**, v. 16, n. 3, p. 171-81, Mar 1994.

OELSCHLAEGER, T. A.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Virulence factors of uropathogens. **Curr Opin Urol**, v. 12, n. 1, p. 33-8, Jan 2002.

PEIGNE, C. et al. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. **Infect Immun**, v. 77, n. 6, p. 2272-84, Jun 2009.

PIATTI, G. et al. Virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 480-7, Feb 2008.

PITOUT, J. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Front Microbiol**, v. 3, p. 9, 2012.

POUTTU, R. et al. *matB*, a common fimbrillin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **J Bacteriol**, v. 183, n. 16, p. 4727-36, Aug 2001.

PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. **Infect Immun**, v. 60, n. 11, p. 4460-7, Nov 1992.

RENDÓN, M. A. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 25, p. 10637-42, Jun 2007.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E. et al. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 6, p. 2097-110, Jun 2005.

RON, E. Z. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 28-32, Feb 2006.

RORIZ-FILHO, J. S. et al. Infecção do trato urinário. <http://www.fmrp.usp.br/revista.Medicina> (Ribeirão Preto). v.43. p. 118-25, 2010.

RUIZ, J. et al. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 12, p. 4445-9, Dec 2002.

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, n. 5, p. 1753-4, May 2000.

_____. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes Infect**, v. 5, n. 5, p. 449-56, Apr 2003.

RUSSO, T. A. et al. *iroN* functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 7156-60, Dec 2002.

SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 9, p. 880-6, Sep 2006.

SADER, H. S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infect Dis**, v. 5, n. 4, p. 200-14, Aug 2001.

SALDAÑA, Z. et al. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. **J Bacteriol**, v. 191, n. 11, p. 3451-61, Jun 2009.

SANTOS, M. A. C. et al. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, v. 33, p. 392-400, 2009.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 1, p. 14-56, Jan 2004.

SKYBERG, J. A. et al. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6287-92, Nov 2006.

SKYBERG, J. A.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 24, 2008.

SORSA, L. J. et al. Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3285-93, Jun 2003.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 3, p. 207-17, Mar 2010.

TORRES, A. G. et al. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. **Infect Immun**, v. 69, n. 10, p. 6179-85, Oct 2001.

VANDEPUTTE-RUTTEN, L. et al. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. **EMBO J**, v. 20, n. 18, p. 5033-9, Sep 2001.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, 2009.

WIESER, A. et al. A multiepitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in mice. **Infect Immun**, v. 78, n. 8, p. 3432-42, Aug 2010.

ZHAO, L. et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 5, p. 1634-44, May 2009.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente os fatores de virulência, Ilhas de Patogecidade e classificar filogeneticamente amostras de *E. coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Detectar os principais genes de virulência presentes em amostras de ExPEC.
- 2 - Identificar a presença de Ilhas de Patogenicidade nas amostras de ExPEC.
- 3 - Classificar filogeneticamente as amostras de ExPEC.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Determination of virulence genes, pathogenicity islands and phylogenetic analysis of Brazilian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human

Department of Microbiology, Center of Sciences Biological, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

All authors contributed equally to this work.

Keywords: ExPEC. Phylogenetic group. Virulence factors; PAI.

ABSTRACT

Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) are widely studied because they can be associated with various pathogens such as respiratory problems, urinary tract infections, neonatal meningitis and septicemia. There are many virulence factors (VF) found in pathogenic bacteria such as ExPEC, which are the *papC*, *papG*, *ecpA*, *iroN*, *fyuA*, *iutA*, *ompT*, *tsh*, *hlyF*, *hlyA* and *iss*. The VF mentioned may be present in pathogenicity islands (PAI), which can encode several other VF. According to the phylogenetic classification, *E. coli* may belong to group A, B1, B2 or D, and bacteria from microbiota belong mainly to phylogenetic group A and the pathogenic distribute themselves in group B2 and also, to a lesser extent, in group D. In this study, by Polymerase Chain Reaction we characterized the VF, researched PAIs and also made the phylogenetic analysis of 96 ExPEC strains isolated from urine and blood of patients in the period of 2008-2011 on the University Hospital of Londrina, comparing with 50 strains of the normal human microbiota. In this study, we highlight the VF *ecpA* (94.79%) and *fyuA* (65.60%) in pathogenic samples and *ecpA* (96%) and *hlyA* (54%) in microbiota samples. A comparison of the distribution of ExPEC and microbiota strains in the phylogenetic groups showed that in the group B2 we had more ExPEC than commensal samples on the other hand, group A had more commensal samples than pathogenic samples, showing that pathogenic samples fit in the group of higher virulence, B2, and commensal samples fit in the group of lower virulence. A comparison of the distribution of the PAIs between microbiota and ExPEC strains showed that the PAI was found more was PAI IV536 (44% and 67.7%), followed by PAI ICFT073 (20% and 45.83%), PAI IICFT073 (10% and 32.3%), PAI I536 (6% and 14.6%) and PAI II536 (6% and 22.9%). These results show that the most common ExPEC was UTI, in females aged 18 to 35 years old. Both phylogenetic characterization, the search for virulence factors and PAIs research contribute in the analysis of the pathogenicity of the bacteria that cause infections, aiding in the understanding of their pathogenesis.

INTRODUCTION

Escherichia coli is part of the family *Enterobacteriaceae*. It is present in human intestinal microbiota as well as in other warm-blooded animals such as cattle, horses and poultry (Holt *et al.*, 1994). *E. coli* are the main etiological agents of bacteremia caused by Gram - negative bacilli (Biendenbach *et al.*, 2004; Pitout, 2012; Sader *et al.*, 2001) It can be classified in different groups according to the site of infection and pathogenic strain. In animals can cause gastroenteritis and a variety of other infections, including UTI, mastitis, endometritis, cystitis, nephritis, arthritis, abortion, osteomyelitis, endocarditis, pneumonia, conjunctivitis, septicemia, among others (Johnson & Russo, 2002a; Johnson & Russo, 2002b; Lloyd *et al.*, 2007; Russo & Johnson, 2000; Wieser *et al.*, 2010). These infections can develop both in animals (such as pathogenic for poultry - APEC) as in humans, suggesting a zoonotic risk (Johnson *et al.*, 2009). ExPEC differs from commensal *E. coli* especially for belonging to different phylogenetic groups and have different virulence factors (Johnson *et al.*, 2001a).

The urinary tract infections (UTI) are considered one of the most common found in the general population (Lopes & Tavares, 2005). The most commonly isolated etiological agent of UTIs is *E. coli*, accounting for approximately 70-85% of urinary patients' infections (Roriz-Filho *et al.*, 2010). There are many virulence genes found in pathogenic bacteria such as ExPEC, among which are the *papC* (P fimbriae), *papG* (P fimbriae), *ecpA* (extracellular adhesive fimbriae), *iroN* (related to the synthesis of the siderophore receptors salmoquelin), *fyuA* (yersiniabactin the receiver), *iutA* (related to the synthesis of aerobactin siderophore receptor), *ompT* (encoding the production of outer membrane protein), *tsh* (temperature sensitive hemagglutinin), *hlyF* and *hlyA* (responsible for the production of hemolysin) and *iss* (serum confers resistance to bacteria) (Belanger *et al.*, 2011; Ewers *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). These factors are commonly found in ExPEC isolated from these samples giving a pathogenic potential that is unusual in commensal samples (SABATÉ *et al.*, 2006). Was recently discovered a new plasmid region called Conserved Virulence Plasmidic (CVP) having 8 genes or operons: *iro*, *iuc*, *sit*, *ompT*, *cva*, *hlyF*, *ets* and *iss* (Lemaître *et al.*, 2013). This region is present in about 10-20% of UPEC samples and samples of 50-60% NMEC and classified mostly as the phylogenetic group B2 (Mahjoub-Messai *et*

al., 2011; Johnson *et al.*, 2008a; Peigne *et al.*, 2009). By presenting these special characteristics, *E. coli* can colonize different extraintestinal sites, survive in environments with low iron concentration, escape the host immune system, resist defense cells and the lytic activity of the serum, invade tissues, and produce cytotoxic substances such as hemolysin and cytotoxic necrotizing factor 1, and then cause extraintestinal infection (Johnson & Russo, 2002a; Russo & Johnson, 2003).

Besides the VF already mentioned, was described in 1990 by Hacker and colleagues, the Genomic Islands (GI) and among them, the pathogenicity islands (PAI) which may carry several virulence factors, which may also be adduced by plasmids and bacteriophages, and may encode all or part of molecular arsenal for these factors enable the microorganism to reach the target host cell. In UPEC, the most studied PAIs are: PAI I and II identified in J96 *E. coli* and CFT073 *E. coli*, PAI I and IV in 536 *E. coli*, verifying that the PAI IV536 is more common in UPEC (Sabaté *et al.*, 2006; Schmidt & Hensel, 2004). The presence of PAIs present in samples of UPEC feature associated with clinically severe forms of infection (Gal-Mor & Finlay, 2006; Kao *et al.*, 1997).

Furthermore, *E. coli* can be classified phylogenetically researching the genes *yjaA* and *chuA*, and a DNA fragment (TSPE4.C2) (Clermont *et al.*, 2000; Kotlowski *et al.*, 2007). According to the presence or absence of these genes *E. coli* is classified to belong to the main phylogenetic groups: B2, A, B1 and D. A new group was found, the group C, which is a subgroup misclassified as group A by Clermont's triplex, despite being more correlated with the group B1 (Clermont *et al.*, 2012; Lemaître *et al.*, 2013). ExPEC strains differs from intestinal and commensal *E. coli* not only due to the presence of several virulence factors such as adhesins, invasins, toxins, siderophores, but also because they belong, mostly to phylogenetic group B2 (Johnson *et al.*, 2008a). Samples of ExPEC belonging to groups A and B1 generally have few virulence factors presenting so low virulence compared samples of ExPEC belonging to phylogenetic groups B2 and D (Ewers *et al.*, 2007; Lemaître *et al.*, 2013).

Therefore the goal of this study was to describe molecularly the virulence factors, pathogenicity islands and phylogenetic analysis of ExPEC isolated from the south of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Isolation and identification of *E. coli* samples

In this study, we used urine samples from urine culture and blood of patients. These samples were collected by medical criteria aiming to support diagnosis and treatment from University Hospital (UH), Universidade Estadual de Londrina (UEL / Pr). We collected 96 samples of ExPEC in the period 2008-2011. As a case-control study, 50 *E. coli* were isolated from faecal samples from volunteers with no infection. Participated in this study, patients older than 18 years, attended by the service outpatient and emergency department of UH and the Clinic Hospital (CH), from UEL, after their consent by signing the Consent clarified (Process 23335/08). *E. coli* strains were isolated and identified by the clinical microbiology laboratory of UH, and sent to Department of Microbiology, UEL, where they were stored for the research.

RS218 and V27 (Johnson & Stell, 2000), EPEC 2348/69 (Levine *et al.*, 1978), J96 (Sabaté *et al.*, 2006) were used as reference strains. The samples were stored in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco®) plus 20% glycerol (Sigma®) media at -80 °C.

Analysis of antimicrobial resistance

The following antimicrobial agents were used: amikacin, aztreonam, cefazolin, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, ertapenem, gentamicin, imipenem, levofloxacin, meropenem, nitrofurantoina, piperacillin + tazobactam, and trimethoprim-sulfamethoxazole through the microdilution automated Phoenix® from UH.

Detecting virulence genes, Pathogenicity islands and Phylogenetic classification using polymerase chain reaction (PCR)

Detecting virulence genes using polymerase chain reaction (PCR)

The primers used for amplification of DNA fragments responsible for virulence characteristics were *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA* (Johnson *et al.*, 2008), *tsh* (Dozois *et al.*, 2000), *hlyA*, *fyuA*, *papG* (Johnson & Stell, 2000), *papC* (Le Bouguenec *et al.*, 1992) and *ecpA* (Blackburn *et al.*, 2009). The amplification of bacterial DNA was performed using 2.5 µl of supernatant in 12,5 µl of reaction mixture, which contained 1.5 U *Taq* polymerase (Invitrogen®), 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP, Invitrogen®), 2.5 mM MgCl₂, PCR Buffer 10X (Invitrogen®) and the appropriate primers.

Ten microliters of each reaction mixture were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel followed by staining with 1 µl Gel Red 20X (Biotium®) (1:500) and visualization in a UV transilluminator. A 1 Kb DNA ladder (Invitrogen®) was run on each gel.

Detecting PAI

Seven islands were analyzed by PCR: PAI III₅₃₆, PAI IV₅₃₆, PAI II_{CFT073}, PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆, PAI I_{J96} and PAI I_{CFT073}. The samples were subject to PCR in a thermal cycler (Applied Biosystems®) with an annealing temperature of 55°C as used by Sabaté and collaborators (2006).

Phylogenetic classification

The phylogenetic classification into groups is carried out according to the method developed by Clermont and collaborators (2000) and modified by Kotlowski and collaborators (2007). Using this method, the isolates are classified into four main groups (A, B1, B2 and D), based on the presence of two genes *yjaA* and *chuA*, and a DNA fragment (TSPE4.C2) (Table 3). The samples were subject to PCR in a thermal cycler (Applied Biosystems®) with an annealing temperature of 54°C. Ten microliters of each reaction mixture were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel followed by staining with 1 µl Gel Red (Biotium®) and visualization in a UV transilluminator. A 1 Kb DNA ladder (Invitrogen®) was run on each gel.

Statistical analysis

Comparison of frequencies among different groups was made by the Fisher exact test. The threshold for statistical significance was a P value <0.05 . The test was performed with the statistical program BioEstat version 5.3.

RESULTS

Analysis of the distribution of extraintestinal infections

Among the 96 patients with extraintestinal infection may be noted that 94.8% of infections were urinary tract, and 75.8% were female, while the remainder (24.2%) belonged to infections in males. The rest of the infections were characterized as blood cultures, accounting 5.2%. In addition, urinary tract infections could be divided into cystitis (86.5%), pyelonephritis (2%) and urosepsis (6.3%). Through the medical records of patients we were able to identify that 24% were recurrent infections. In addition to observing the UTI was more frequent in female patients (75.8%), we note that the age that the infection is more appear is between 18 and 35 years, corresponding 42% of cases.

We noticed in our research that the graph of the frequency of UTIs reverses when comparing men and women, as can be seen in Figure 1. While females have a higher incidence in the youngest age group surveyed, between 18-35 years (42%), males have their peak of infection from the age of 50, representing 50% of cases among men with 51-75 years.

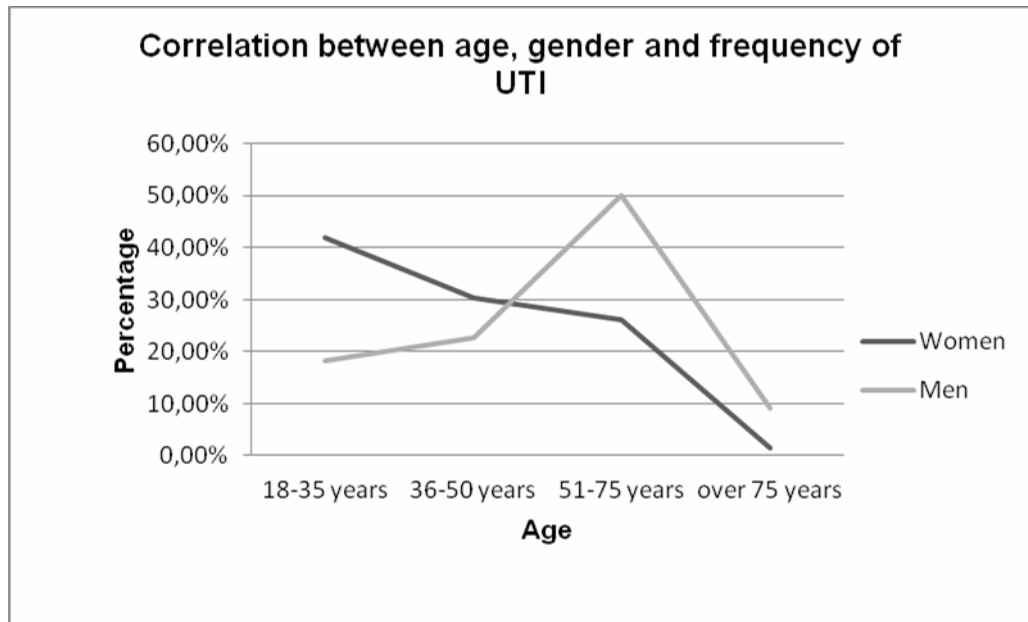


Figure1. Correlation between age, gender and frequency of UTI of 91 patients seen at University Hospital (UH) and the Hospital of the State University of Londrina (UEL-HC) in the period 2008-2011.

Antimicrobial resistance

In the analysis of antimicrobial resistance performed on samples of ExPEC is observed that among the 96 samples, 42 (43.75%) had at least one resistance to antimicrobial. Many samples (28%) showed resistance to three or more antimicrobials of 15 tested. Antimicrobials that stood out as bacterial resistance were sulfamethoxazole-trimethoprim (35.41%), ciprofloxacin (33.33%), levofloxacin (32.29%), gentamicin (11.45%) and cefazolin (8.33 %). Of the 50 microbial samples used as negative control, only 6 (12%) were resistant to at least one antibiotic. The infection samples are more resistant than normal microbiota samples ($p < 0,01$).

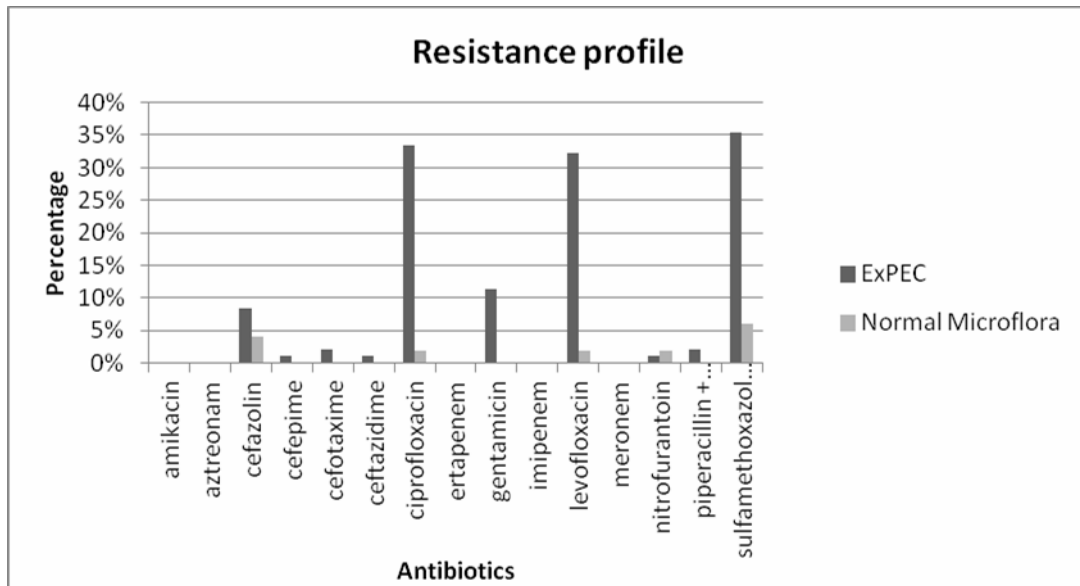


Figure2. Difference in resistance between ExPEC and Microbiota.

Analysis of Virulence Factors

In this study, we highlight the gene *ecpA* (94.8%) and *fyuA* (65.60%), as found in most samples, and both more distributed in the phylogenetic group B2, as shown in Table 1. Among the other iron uptakers, *iroN* and *iutA*, the percentage remained between 35-50% of positivity and they are also distributed among all groups but with a higher percentage in group B2 and D. Proteases and toxins, *ompT*, *tsh*, *hlyF* and *hlyA* genes had a lower positive (10-20%) and were also well distributed among phylogenetic groups, with emphasis in group B1 and B2. The *iss* gene, responsible for bacterial survival to complement, got 20% positivity in the samples ($p > 0,05$) and was more distributed in group B1. Finally, among the adhesins *papC*, *papG*, there was a little variation in positivity (20-22% $p > 0,05$) and they were more concentrated in groups B2 and D.

In the negative control, the majority of these genes appeared less frequently or was not found (the exception is the *ecpA* gene), as is the case of *iutA* gene ($p < 0,01$). Most genes were present between 0-15% of the samples.

Out of 96 samples of ExPEC isolated, 18 (18.75%) belonged to group A, 19 (19.79%) belonged to group B1, 33 (34.38%) to group B2 and 26 (27.08%) were classified as group D.

TABLE 1. Frequency of the virulence factor compared between 96 samples of ExPEC and 50 samples of microbiota.

Virulence Factor	ExPEC (n=96)	Microbiota (n=50)
<i>iroN</i>	34,38%*	10,00%
<i>hlyF</i>	19,79%*	6,00%
<i>iutA</i>	41,67%*	0,00%
<i>ompT</i>	22,92%*	4,00%
<i>iss</i>	20,83%	8,00%
<i>fyuA</i>	65,6%*	46,00%
<i>tsh</i>	9,38%	2,00%
<i>hlyA</i>	18,75%	54%*
<i>papC</i>	22,90%	12,00%
<i>papG</i>	20,83%	12,00%
<i>ecpA</i>	94,80%	96%

Fisher exact test
*p<0.05

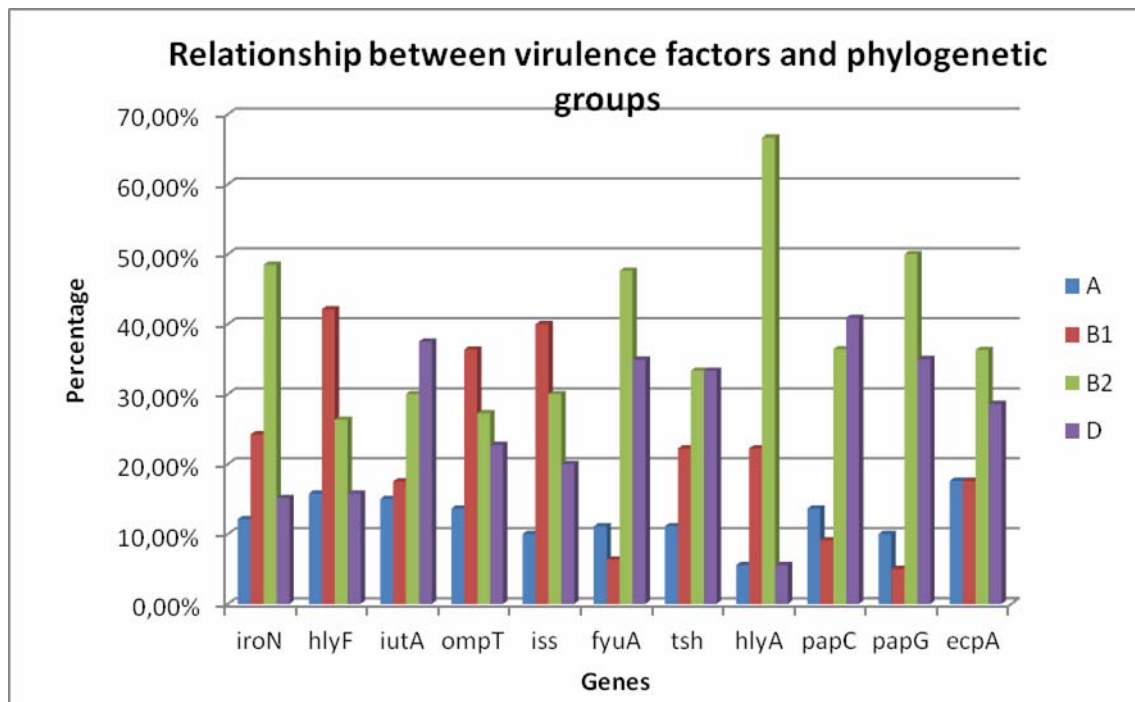


Figure3. Distribution of phylogenetic groups of ExPEC between Virulence Factors studied.

Analysis of the distribution of PAIs on the ExPEC samples

50 samples were isolated from commensal *E. coli* and the PAIs were found in 26 (52%) samples. Of the 96 ExPEC samples analyzed in our study, 75 (78%) were positive for the PAI. Even finding PAIs in commensal samples, this

percentage shows much smaller than that found in pathogenic samples. A comparison of the distribution of pathogenicity islands between commensal samples and ExPEC samples are showed in table 2. In our study PAI III536 was found in only one sample (1.04% $p>0,05$), while PAI IJ96 ($p>0,05$) was not detected in any of the isolates. The distribution of ExPEC's and Microbiota's PAIs of this work is illustrated by Figure 4.

The distribution of the PAIs of ExPEC and normal microbiota in the phylogenetic groups is shown in Figure 5, and shows that most ExPEC samples that have island (78%) belong to group B2 (42.7%). Then appears the group D (30.7%), group A (14.7%) and less frequent is the group B1 (12%). In samples of normal microbiota that have islands (52%) most of them belong to group A (84,6%). Then we have the group B2 (11,5%), B1 (3,84%) and D (0%). Of 96 ExPEC isolates, three or more PAIs were found in 30 (31.25%) ExPEC samples. Samples that were classified as the group with increased virulence, B2, 86.7% had three or more PAIs. However, the samples that did not have PAIs, they were more distributed in group B1 (47.6%).

TABLE 2. Percentage of PAIs found in ExPEC samples and microbiota samples.

PAI	ExPEC	Microbiota
IV 536	67.7%*	44%
I CFT073	45.83%*	20%
II CFT073	32.3%*	10%
II 536	22.9%*	6%
I 536	14.6%	6%
III 536	1.04%	0%
I J96	0%	0%

* $p<0.01$

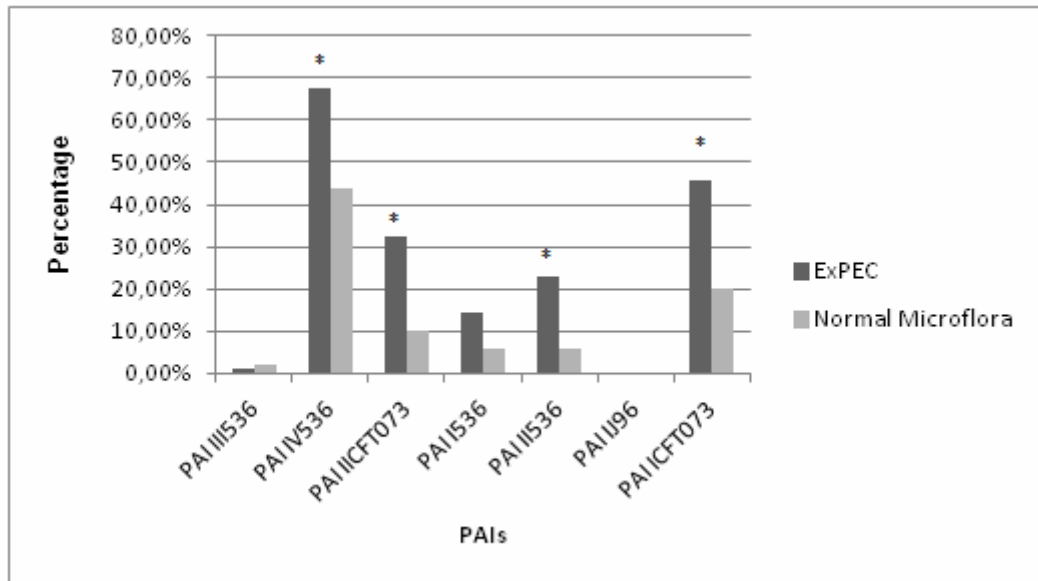


Figure 4. Analysis of Pathogenicity Islands in samples of ExPEC and Normal microbiota.

(*) $p < 0,01$

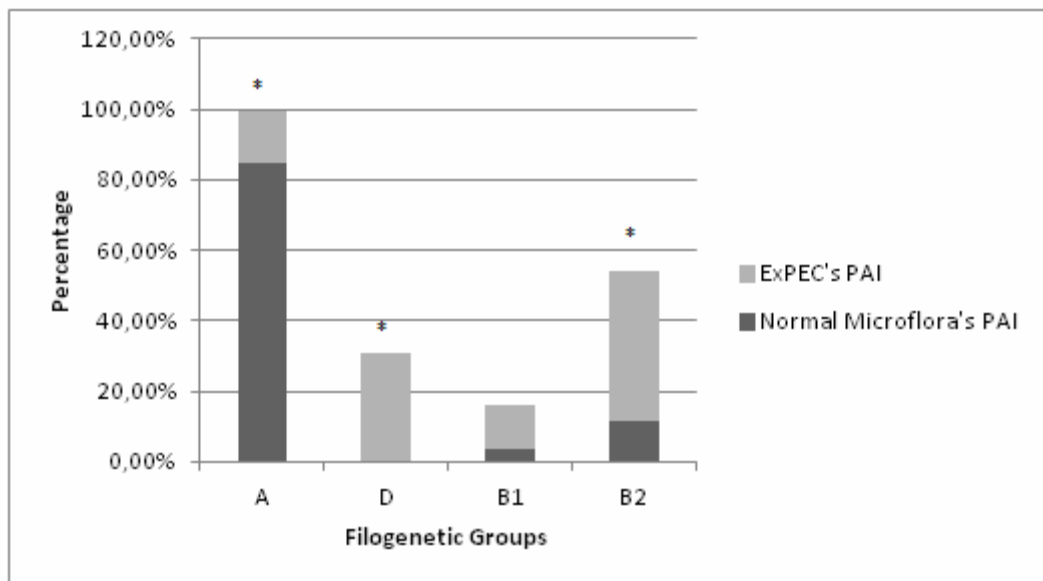


Figure 5. Distribution of ExPEC and Normal Microbiota's PAI in the filogenetic groups.

(*) $p < 0,01$

DISCUSSION

Symptomatic urinary tract infection (UTI) is among the most common bacterial infections of humans, being the second most common infection in the

general population, predominantly among adults and in female patients, and according to Mora and colleagues (2008), this disease affects about 80% of women.

Our data corroborate with other researches (Valiquette, 2001; Mora *et al.*, 2008), in which this infection affects mostly women, either by their anatomical training, active sex life, age or previous cases of cystitis or the combination of these various risk factors (Finegold *et al.*, 1991; Spiegel, 1991; Schaechter *et al.*, 2002; Toval *et al.*, 2014).

Symptomatic UTI affecting up to 30% of women aged 20 to 40 years, greater than prevalence in men (Walsh *et al.*, 2002). In this study the majority (42%) of women patients with UTI were in the group between 18 and 35 years old. While females have a higher incidence in the youngest age group surveyed, between 18-35 years, males have their peak of infection from the age of 50. At this age women are already reducing episodes of urinary infection, while the men begin to develop this disease more frequently.

According to Head (2008) and Lopes and Tavares (2004), although UTIs are more common in women, the incidence increases among men above 50 years. This is due to invasive urinary tract procedures such as bladder catheterization and the occurrence of prostatic disease as more factors involved in the increased incidence in males.

It has been concerned the resistance to several drugs used in the treatment of infections caused by *E. coli*. Foxman (2002) also reported that as a result of antimicrobial therapy may be the increasing prevalence of resistant bacteria by selects those who end up modifying its resistance mechanism. The distribution of antimicrobial susceptibility data of microorganisms changes from time to time and from place to place. Antimicrobials that are widely prescribed for treatment of UTI episodes are beta-lactams, trimethoprim-sulfamethoxazole, quinolones, fluoroquinolones and aminoglycosides (Arslan *et al.*, 2005; Olorunmola *et al.*, 2013; Karlowsky *et al.*, 2014; Teichmann *et al.*, 2014). In south of Brazil we don't have recent data about the antimicrobial resistance. As well as the work of Teichmann and colleagues (2014) we also found a great resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole antimicrobial (44.7% vs 35.4%). Another antibiotic that we found with a high resistance in our study was the quinolone ciprofloxacin (33.3%) which is similar with the literature but not very high as other studies (Olorunmola *et al.*, 2013; Prakash & Saxena, 2013; Qiao *et al.*, 2013; Teichmann *et al.*, 2014). In the analysis of

antimicrobial resistance held, many samples had at least one resistance to some antimicrobials cited. Others already were resistant to three or more. Even in samples of normal microbiota resistance to these antimicrobial agents were identified. It is for this reason that it is necessary to perform susceptibility testing to antimicrobial because the samples of *E. coli* do not show a constant susceptibility profile of these drugs.

It is known that ExPEC, by presenting several virulence factors, are able to survive in almost all anatomical sites. Thus, they may colonize the urinary tract blood, among others, resulting in infections.

Among the eleven tested virulence genes (*iss*, *ompT*, *iutA*, *hlyF*, *hlyA*, *iroN*, *ecpA*, *papC*, *papG*, *tsh* and *fyuA*), we observed the presence of all of them distributed among our ExPEC strains and microbiota strains. Other authors (Johnson *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009) also found similar results to this research, finding the positivity of all the factors in the isolated samples. The *ecpA* gene was first identified in NMEC isolates but now is also identified in all classes of pathogenic and non-pathogenic *E. coli*. A high percentage of this gene was found in our study both in ExPEC and microbiota (94.8% and 96%). ECP is considered as a new variant of the chaperon-usher (CU) fimbriae family and has a important role in adherence (Garnett *et al.*, 2012; Stacy *et al.*, 2014)

The results show that the presence of virulence factors is very important in pathogenic bacteria and is a form of this microorganism develop and establish in the host to survive and multiply , thus resulting in the extraintestinal infections.

It has been extensively studied the correlation between human ExPEC, especially UPEC and APEC. APEC is responsible for avian colibacillosis, which refers to any localized or systemic infection such as an acute fatal septicemia or subacute pericarditis and airsacculitis. It is responsible for huge financial losses to the poultry industry due to mortality, loss of production and condemnations of carcasses (Zhao *et al.*, 2009). Human ExPEC and APEC have similarities in serogroups and virulence genes (Bonacorsi *et al.*, 2000; Oelschlaeger *et al.*, 2002; Bullen *et al.*, 2005). The presence of a common set of genes (*iutA*, *iroN*, *iss*, *ompT*, *hlyF*) associated with virulence between APEC and UPEC strains, as well as similar phylogenetic disease pattern, indicates the genetic relationship between APEC and UPEC isolates (Kaper *et al.*, 2004; Moulin-Schouleur *et al.*, 2006; Ron, 2006).

Skyberg et al (2006) suggested that plasmids from APEC serves as reservoirs for genes associated with urovirulence since the commensal sample received from APEC plasmids became able to grow in human urine and mice's kidney. In our study we found the genes *iutA*, *iroN*, *iss*, *ompT*, *hlyF* that are common in APEC and UPEC samples.

UTI is usually associated with fecal microbiota microorganisms that express additional virulence factors. Many authors believe that the fecal microbiota of the host is the primary source of UPEC isolates (Moreno *et al.*, 2008; Toval *et al.*, 2014). The analysis of the samples showed that normal microbiota bacteria present in stool are not free from virulence genes or even pathogenicity islands for this reason can provide their installation and subsequent urinary tract infection.

The comparison of the existence of these virulence genes in samples of normal microbiota and ExPEC showed that some genes are significant to cause infection, as was present in most of the samples collected. Genes such as *iroN*, *iutA*, *ompT* and *hlyF* showed a significant difference to the number found in the human microbiota. This leads us to believe that the samples obtained this positivity has possibly plasmid CVP that is a complete conserved region which contains 8 operons or genes (Lemaître *et al.*, 2013). Lamaître also observed that this region is present in 10-20% of UPEC and 50-60% of NMEC being classified as group B2 according to Clermont classification.

The classification of our isolates from Londrina, Paraná showed the lowest percentage in group A as it was expected since this group is classified as bacteria belonging to the normal microbiota (Moreno *et al.*, 2005). *E. coli* from microbiota also are included in group B1, could actually have originated from any of the phylogenetic groups, depending on the geographical region studied (Santos *et al.*, 2013). There was also positive in the ExPEC phylogenetic groups B1, which are *E. coli* that colonize the intestinal tract and are associated with intestinal infections (Moreno *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009). Isolates belonging to groups A and B1 were less frequent on samples for other countries regions than the frequencies that we found in our Brazilian region (about 10% vs 20%). Some factors are proposed to explain this difference like the climate, population habits, and the use of antimicrobials (Santos *et al.*, 2013).

We confirmed the presence of Clermont B2 group with the highest percentage found in the samples, demonstrating the high virulence of ExPEC since

this group is characterized by being the most virulent (Ewers *et al.*, 2007). The frequencies of B2 strains are higher in other countries (60 vs 34.38%) when we compared with our results; while group D strains appear in lower frequencies (20 vs 27%) (Sannes *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005). According to other studies (Clermont *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001b), UPEC isolates also belonged mainly to phylogenetic group most virulent, B2, demonstrating that this being in accordance with what has been reported in literature.

However, the application of the method of Clermont and colleagues (2000) to classify genetically ExPEC is somewhat limited when it comes to determining the evolutionary descent and the relationship between them, and these samples a more holistic view. For higher resolution, require such procedures as the Multilocus Sequence Typing (MLST).

The presence of virulence genes in phylogenetic groups is important to be able to characterize these groups. Studies show that as have a greater number of virulence factors, the group is more pathogenic. Likewise, at least as virulence factors lower the risk encountered in this group cause some kind of infection as in the case of strains of normal microbiota (Ewers *et al.*, 2007).

There are several studies suggesting that virulent clonal groups are mainly derived from phylogenetic group B2, and to a lesser extent group D, explaining the predominance of groups B2 and D among clinical isolates (Johnson & Russo, 2005).

We found in our samples of ExPEC a greater distribution of virulence factors in phylogenetic groups B2 and D (34.38%; 27.08%), in the same way as Johnson and Russo authors. In group B2, for being registered as the most virulent, was expected greater presence of all tested genes. The group A, as well as expected, did not show many virulence factors.

Of strains isolated from both microbiota and infections, the pathogenicity islands were found. Even finding PAIs in microbiota samples, this percentage shows smaller (52%) than that found in pathogenic samples (78%). The distribution of PAIs of ExPEC samples of this study also corroborate the results presented by UPEC Sabaté and colleagues (2006).

PAI IV536 was found most frequently in our samples, reported in the literature as the most present in UPEC PAI (Schubert *et al.*, 1998; Schubert *et al.*, 2002). According to Middendorf and colleagues (2004) this island is quite stable in *E.*

coli 536 - O6: K15: H31 (originally isolated from a patient with acute pyelonephritis) which could explain its high frequency in the tested samples.

The PAI III536 showed a low percentage in ExPEC samples (1.04%), and according to some studies, it is not responsible for pathogenicity developed by bacteria. This Island is classified as unstable, and easy to be lost, this may explain the low percentage found in our samples.

According Sabaté and colleagues (2006), because PAI IV536 is more stable, possibly this was the first to enter the chromosome. It was never found alone in an isolated group B2, it was always present with PAI ICFT073. Already in isolates that did not belong to group B2, these islands were often combined with other islands. So probably the PAI ICFT073 may have been the third to be incorporated into the chromosome followed by PAI IJ96 and PAI I536. Since the PAIs I536 and III536 are less frequent in isolated, being unusual and present only in samples of high virulence, they have been the last to be acquired.

CONCLUSIONS

The increased resistance to antimicrobials Trimethoprim-sulfamethoxazole, levofloxacin, ciprofloxacin, gentamicin and cefazolin, indicates the need to perform tests to examine the sensitivity of ExPEC isolates to antimicrobials in order to assist in the treatment of patients.

A research of virulence factors of ExPEC is necessary since the presence of these genes confer increased resistance to bacteria defense mechanisms of the body compared to the normal microbiota, by increasing its pathogenicity, surviving, multiplying and causing infections.

It is also important define bacteria's phylogenetic group in order to characterize the most virulent strains and the less virulent strains.

For carrying virulence factors, the characterization of these PAIs are extremely important for understanding the molecular arsenal coding for these factors can achieve the target in the host cell causing infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Decit/SCTIE/MS/CNPq, Fundação Araucária (Edital PPSUS: Gestão Compartilhada em Saúde – 2009).

We thank the Araucária Foundation - Paraná State, and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), who enabled the execution of this study. The authors also thank the University Hospital from the Universidade Estadual de Londrina for providing the samples for our research.

REFERENCES

- Bélangier, B., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., Dozois, C. M (2011).** *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **62**, 1-10.
- Biendenbach, D. J., Moet, G. J., Jones, R. N (2004).** Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection from SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2002). *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **50**, 59-69.
- Blackburn, D., Husband, A., Saldaña, Z., Nada, R. A., Klena, J., Qadri, F., Girón, J. A (2009).** Distribution of the *Escherichia coli* Common Pilus among Diverse Strains of Human Enterotoxigenic *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1781-1784.
- Bonacorsi, S. P. P., Clermont, O., Tinsley, C., Gall, L. I., Beaudoin, J. C., Elion, J., Nassif, X., Bingen, E (2000).** Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis associated strains. *Infect. Immun.* **68**, 2096–2101.
- Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix, D (1969).** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**, 459-472.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., Spalding, P. B., Ward, C. G (2005).** Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**, 325–330.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E (2000).** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4555-4558.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M (2013).** The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 58-65.
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Faribrother, J.M., Desautels, C., Curtiss III, R.** Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect. Immun.* **68**. 4145-4154, 2000.
- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiebling, S., Alt, K., Antão, M. E., Laturnus, C., Diehl, I., Glodde, S. & other authors (2007).** Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they?. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**, 163-176.

- Ewers, C., Antão, E. M., Diehl, I., Philipp, H. C., Wieler, L. H (2009).** Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic Potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 184–192.
- Foxman, B (2002).** Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.* **113**, 5-13.
- Gal-Mor, O. & Finlay, B. B (2006).** Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cel. Microbiol.* **11**, 1707-1719.
- Garnett, J.A., Martínez-Santos, V.I., Saldaña, Z., Pape, T., Hawthorne, W., Chan, J., Simpson, P.J., Cota, E., Puente J.L. & other authors (2012).** Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *PNAS.* **109**, 3950-3955.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R., Goebel, W (1990).** Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microbial. Pathog.* **8**, 213–25.
- Head, K. A (2008).** Natural approaches to prevention and treatment of infections of the lower urinary tract. *Altern. Med. Rev.* **13**, 227-44.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T (1994).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9.edn. Baltimore, Md: Williams & Wilkins.
- Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M., Stell, A. L (2001).** Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **183**, 78–88.
- Johnson, T. J., Wannenuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., Nolan, L.K (2008a).** Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3987-3996.
- Johnson T.J., Wannemuehler Y., Johnson S.J., Stell A.L., Doetkott C., Johnson, J.R., Kim, K.S., Spanjaard, L., Nolan, L.K (2008b).** Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ. Microbiol.* **74**, 7043–7050.
- Johnson, T.J.; Logue, C. M.; Wannenuehler, Y.; Kariyawasam, S.; Doetkott, C.; Debroy, C.; White, D. G.; Nolan, L.K (2009).** Examination of the Source and Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Contaminating Retail Poultry Meat. *Foodborne Pathog Dis.***6**, 657-667.
- Johnson, J. R. & Russo, T. A (2002a).** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”. *J. Lab. Clin. Med.* **139**, 155-162.
- Johnson, J. R. & Russo, T. A (2002b).** Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. *J. Infect. Dis.* **186**, 859-864.
- Johnson, J. R. & Stell, A (2000).** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* **181**. 261-272.
- Kao, J., Stucker, D. M., Warren, J. W., Mobley, H. L. T (1997).** Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. *Infect. Immun.* **65**. 2812-2820.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140.

Karlowsky J.A., Denisuik A. J., Lagacé-Wiens P.R.S., Adam H.J., Baxter M.R., Hoban D.J., Zhanel G.G (2014). In Vitro Activity of Fosfomycin against *Escherichia coli* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in Canada as Part of the CANWARD Surveillance Study. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**, 1252–1256.

Kotlowski, R., Bernstein, C. N., Sepehri, S., Krause, D.O (2007). High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut.* **56**, 669-675.

Le Bouguenec, C., Archambaud, M., Labigne, A (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1189-1193.

Lemaître, C., Mahjoub-Messai, F., Dupont, D., Caro, V., Diancourt, L., Bingen, E., Bidet, P., Bonacorsi, S (2013). A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. *PLOS ONE.* **8**, e74423.

Levine, M. M., Nalin, D. R., Hornick, R. B., Bergquist, E. J., Waterman, D. H., Young, C. R., Sotman, S., Rowe, B (1978). *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *The Lancet.* **311**, 1119-1122.

Lloyd, A. L., Rasko, D. A., Mobley, H. L.T (2007). Defining Genomic Islands and Uropathogen-Specific Genes in Uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 3532–3546.

Lopes, V. H. & Tavares, W (2004). Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira (AMB) e Conselho Federal de Medicina (CFM); *Soc. Bras. Infect. Soc. Bras. Uro.* Infecções do Trato Urinário: Diagnóstico.

Lopes, V. H. & Tavares, W (2005). – Infecções do trato urinário: diagnóstico. Projeto diretrizes da autoria da Sociedade Brasileira de Infecçiology e Sociedade Brasileira de Urologia. *Medicina Baseada em Evidências. Ver Assoc Med Bras.* **51**, 301-1.

Mahjoub-Messai, F., Bidet, P., Caro, V., Diancourt, L., Biran, V., Aujard, Y., Bingen, E., Bonacorsi, S (2011). *Escherichia coli* Isolates Causing Bacteremia via Gut Translocation and Urinary Tract Infection in Young Infants Exhibit Different Virulence Genotypes. *J. Infect. Dis.* **203**, 1844–1849.

Mora, J. F., Menezes, I., Requia, K. M., Sardiglia, U. C (2008). Perfil dos Pacientes com Infecções do Trato Urinário Diagnosticados no Município de Flor do Sertão – SC*. *RBAC.* **40**, 321-323.

Moreno, E., Planells, I., Prats, G., Planes, A. M., Moreno, G., Andreu, A (2005). Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* **53**, 93–99.

- Moreno E., Andreu A., Pigrau C., Kuskowski M.A., Johnson J.R., Prats G (2008).** Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2529–2534.
- Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M. R., Bree, A., Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., Blanco, J (2006).** Common virulence factors and genetic relationships between O18 : K1 : H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3484–3492.
- Oelschlaeger, T. A., Dobrindt, U., Hacker, J (2002).** Virulence factors of uropathogens. *Curr. Opin. Urol.* **12**, 33–38.
- Olorunmola, F.O., Kolawole, D.O., Lamikanra, A (2013).** Antibiotic resistance and virulence properties in *Escherichia coli* strains from cases of urinary tract infections. *Afr. J. Infect. Dis.* **7**, 1–7.
- Peigne, C., Bidet, P., Mahjoub-Messai, F., Plainvert, C., Barbe, V., Me´Digue, C., Frapy, E., Nassif, X., Denamur, E. & other authors (2009).** The Plasmid of *Escherichia coli* Strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to Avian Pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infect. Immun.* **77**, 2272–2284.
- Pitout, J.D.D (2012).** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front. In Microbiol.* **3**, 1-7.
- Prakash, D. & Saxena, R.S (2013).** Distribution and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Bacterial Pathogens Causing Urinary Tract Infection in Urban Community of Meerut City, India. *ISRN Microbiol.* **2013**, 1-13.
- Qiao L.D., Chen S., Yang Y., Zhang, K., Zheng, B., Guo, H-F., Yang, B., Niu, T-J., Wang, Y., & other authors (2013).** Characteristics of urinary tract infection pathogens and their in vitro susceptibility to antimicrobial agents in China: data from a multicenter study. *BMJ Open.* **3**, e4152.
- Ron, E. Z (2006).** Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 28–32.
- Roriz-Filho, J. S., Vilar, F. C., Mota, L. M., Leal, C. L., Pisi, P. C. B (2010).** Infecção do trato urinário. <http://www.fmrp.usp.br/revista>. **43**, 118-25.
- Russo, T. A. & Johnson, J. R (2000).** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**, 1753-1754.
- Russo, T. A. & Johnson, J. R (2003).** Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbiol. Infec.* **5**, 449-456.
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., Prats, G (2006).** Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 880-886.
- Sader, H. S., Gales, A. C., Pfaller, M. A., Mendes, R.E., Zoccoli, C., Barth, A., Jones, R. N (2001).** Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz. J. Infect. Dis.* **5**, 200-214.

- Sannes, M.R., Kuskowski, M.A., Owens, K., Gajewski, A., Johnson, J.R (2004).** Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J. Infect. Dis.* **190**, 2121-2128.
- Santos, M. A. C., Zidko, M. A. C., Pignatari, C. A. C., Gales, A. C., Silva, R. M. A (2009).** Virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. *O Mundo da Saúde.* **33**, 392-400.
- Santos A.C.M., Zidko A.C.M., Pignatari A.C., Silva R.M (2013).** Assessing the diversity of the virulence potential of *Escherichia coli* isolated from bacteremia in São Paulo, Brazil. *Bra. J. Med. Biol. Res.* **46**, 968-973.
- Schaechter, M., Engleberg, N. C., Eisenstein, B. I., Medoff, G (2002).** Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3rd edn. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.
- Schmidt, H. & Hensel, M (2004).** Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol.* **17**, 14-56.
- Skyberg, J. A., Johnson, T. J., Johnson, J. R., Clabots, C., Logue, C.M., Nolan, L.K (2006).** Acquisition of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Plasmids by a Commensal *E. coli* Isolate Enhances Its Abilities To Kill Chicken Embryos, Grow in Human Urine, and Colonize the Murine Kidney. *Infect. Immun.* **74**, 6287-6292.
- Stacy, A.K., Mitchell, N.M., Maddux, J.T., de la Cruz M.A., Durán L., Girón, J.A., 3rd, R.C., Mellata, M (2014).** Evaluation of the Prevalence and Production of *Escherichia coli* Common Pilus among Avian Pathogenic *E. coli* and Its Role in Virulence. *PLOS ONE.* **9**, e86565.
- Teichmann A., Agra, H.N.C.A., Nunes, L.S., Rocha, M.P., Renner, J.D.P., Possuelo, L.G., Carneiro, M., Rieger, A., Benitez, L.B., Valim, A.R.M (2014).** Antibiotic resistance and detection of the sul2 gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in patients from Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* **8**, 39-43.
- Toval F., Köhler C., Vogel U., Wagenlehner F., Mellmann A., Fruth A., Schmidt, M.A., Karch, H., Bielaszewska, M., Dobrindt, U (2014).** Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Hospital Inpatients or Outpatients with Urinary Tract Infection. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 407-418.
- Valiquette, L (2001).** Urinary tract infections in women. *Can. J. Urol.* **8**, 6-12.
- Wieser, A., Romann, E., Magistro, G., Hoffmann, C., No`Renberg, D., Weinert, K., Schubert, S (2010).** A Multiepitope Subunit Vaccine Conveys Protection against Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Mice. *Infect. Immun.* **78**, 3432-3442.
- Zhao, L., Gao, S., Huan, H., Xu, X., Zhu, X., Yang, W., Gao, Q., Liu, X (2009).** Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiol.* **155**, 1634-1644.

5 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

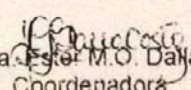
- A maior resistência aos antimicrobianos Sulfametoxazol-Trimetoprim, Levofloxacina, Ciprofloxacina, Gentamicina e Cefazolina, indica a necessidade de realizar testes para analisar a sensibilidade dos isolados de ExPEC aos antimicrobianos afim de auxiliar no tratamento dos pacientes.
- A pesquisa dos fatores de virulência de ExPEC faz-se necessária já que a presença destes genes conferem a bactéria maior resistência aos mecanismos de defesa do organismo, quando comparado com a microbiota normal, por aumentar sua patogenicidade. Deste modo, conseguindo então sobreviver, multiplicar e causar as infecções estudadas.
- É importante a definição dos grupos filogenéticos das amostras para caracterização das amostras nos grupos de maior e menor virulência.
- Por carregarem fatores de virulência, a caracterização das PAIs são de extrema importância para o entendimento da codificação do arsenal molecular para que esses fatores consigam alcançar o alvo na célula hospedeira vindo a causar infecções.

ANEXO

ANEXO A



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
 Registro CONEP 268

Parecer PF Nº 168/08 CAAE Nº 0164.0.268.000-08 FOLHA DE ROSTO Nº 207682	Londrina, 25 de agosto de 2009.
PESQUISADOR: RENATA KATSUKO TAKAYAMA KOBAYASHI PROPPG (Processo 23335/08)	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p>"CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICA EXTRAINTestinal (ESPEC) ISOLADAS DE HUMANOS"</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/Uel relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>O pesquisador deverá apresentar comprovante da regularização do banco de amostras biológicas e espécimes isolados em três meses, apresentar relatórios parciais a cada seis meses, sendo o primeiro em janeiro/2010, e o relatório final ao término da pesquisa.</p>	
<p align="center">Atenciosamente,</p> <p align="center">  Prof.ª Dra. Ester M.O. Dalla Costa Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/Uel </p>	