



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA PAULA DAGA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL**

---

Londrina  
2019

ANA PAULA DAGA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA EXTRAINTestinal**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Carolina Vespero

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Daga, Ana Paula .

Estudo Epidemiológico e molecular de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal / Ana Paula Daga. - Londrina, 2019.  
92 f. : il.

Orientador: Eliana Carolina Vespero.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, , 2019.  
Inclui bibliografia.

1. Infecções extraintestinais por *Escherichia coli* - Tese. 2. Classificação filogenética - Tese. 3. Fatores de virulência - Tese. 4. Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) - Tese. I. Vespero, Eliana Carolina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. . III. Título.

ANA PAULA DAGA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE *Escherichia coli*  
PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eliana Carolina Vespero  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marcia Regina Eches Perugini  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Renata Katsuko T. Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de Fevereiro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Professora Dra. Eliana Carolina Vespero, por toda a paciência, ensinamentos e empenho com que sempre me orientou neste trabalho. Muito obrigada por ter me corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do HU-UEL, em especial ao Laboratório de Microbiologia Clínica, que sempre estiveram dispostos em ajudar.

Ao Laboratório de Microbiologia da UEL (NIP3), em especial a Professora Dra. Renata Katsuko T. Kobayashi pela contribuição com a orientação do trabalho e a Vanessa Koga Lumi pelo auxílio nos experimentos.

Da mesma forma, quero agradecer a Professora Dra. Marcia Regina Eches Perugini pela revisão do trabalho e pelas sugestões pertinentes.

Não poderia deixar de agradecer à minha família e amigos pelo apoio incondicional que me deram, especialmente ao meu esposo Marco, pela compreensão e apoio ao longo da elaboração deste trabalho e aos meus pais por todo carinho e incentivo.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer à Deus, que por tantas vezes me escutou e me fortaleceu nos momentos de dúvida e de fraqueza.



**“Existem apenas duas maneiras de viver a vida. Uma é como se nada fosse um milagre. A outra é como se tudo fosse um milagre”**

Albert Einstein

DAGA, Ana Paula. **Estudo epidemiológico e molecular de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

*Escherichia coli* é um habitante comensal comum do trato gastrointestinal e um dos patógenos mais importantes em humanos. *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) é um descritor para os isolados de *E. coli* capazes de causar doença extraintestinal. O objetivo deste estudo foi investigar e comparar os determinantes de virulência da ExPEC de diferentes materiais clínicos. Este estudo incluiu 183 amostras de *E. coli*, 48 isolados da corrente sanguínea, 42 de líquido e secreções, 44 isolados produtores de  $\beta$ -Lactamase de Espectro Estendido (ESBL), de urina de pacientes internados com infecção do trato urinário (ITU) e 49 *E. coli* sensíveis a todos os antimicrobianos, de urina de pacientes ambulatoriais com ITU. Utilizando a reação da PCR, investigou-se a presença de fatores de virulência (VFs), ilhas de patogenicidade (PAIs), ESBL do tipo cefotaximase (CTX-M) e a classificação filogenética (A, B1, B2, C, D, E e F). A análise da variabilidade genética de *E. coli* de sangue foi realizada pelo *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) e os dados epidemiológicos e demográficos foram obtidos através da análise de prontuários e exames laboratoriais. O gene *fimH* foi o mais prevalente em todos os materiais clínicos. *E. coli* isoladas de sangue e líquido/secreção apresentaram uma prevalência estatisticamente maior para *fimH* e *papC*, assim como, para os genes relacionados à resistência sérica (*traT*, *iss* e *ompT*) em comparação com amostras urinárias. Ao contrário da cápsula K5, que foi mais prevalente em amostras urinárias. Em geral, *E. coli* de urina de pacientes ambulatoriais apresentaram maior prevalência de FVs quando comparados *E. coli* de urina de pacientes internados. A prevalência de PAIs nos diferentes materiais clínicos foi semelhante, com exceção do PAI IV536, que foi maior no sangue do que em *E. coli* urinária de pacientes internados. O filogrupo B2 foi o mais prevalente, seguido do filogrupo B1 para sangue e urina de pacientes internados, e E para líquidos secreção e urina de pacientes ambulatoriais. O filogrupo A foi estatisticamente mais prevalente em amostras de *E. coli* urinárias. Os isolados B2 apresentaram a maior prevalência de FVs e PAIs. Oito (16,7%) dos isolados de *E. coli* de sangue foram caracterizados como produtores de ESBL do tipo CTX-M, sendo que, CTX-M-15 foi a mais prevalente. A análise da variabilidade genética identificou duas linhagens clonais e vários isolados de sangue não relacionados. Dos pacientes com infecção da corrente sanguínea por *E. coli*, 50% foram secundárias à infecção do trato urinário e 12,5% foram secundárias a doenças abdominais, sendo que a mortalidade associada à bacteremia por *E. coli* foi de 33,3%. Em conclusão, ExPEC possui uma variedade de determinantes de virulência envolvidos no estabelecimento da infecção, e comumente apresenta resistência a múltiplos fármacos, implicando na gravidade da infecção. O conhecimento de fatores determinantes, como a patogenicidade e os dados epidemiológicos do processo infeccioso, são informações importantes para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e no manejo e tratamento de pacientes com infecção extraintestinal por *E. coli*.

**Palavras chave:** ExPEC; Determinantes de virulência;. Classificação filogenética. ESBL. CTXM-15.

DAGA, Ana Paula. **Epidemiological and molecular study of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli***. 92 pp. Dissertation (Master's degree in Clinical and Laboratory Physiopathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is a common commensal inhabitant of the gastrointestinal tract and one of the most important pathogens in humans. Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) is a descriptor for *E. coli* isolates capable of causing extraintestinal disease. The objective of this study was to investigate and compare the virulence determinants of ExPEC from different clinical materials. This study included 183 *E. coli* samples, 48 bloodstream isolates, 42 liquid and secretions, 44 ESBL-producing isolates of urine samples from patients hospitalized with urinary tract infection (UTI) and 49 *E. coli* sensitive to all antimicrobials, from outpatient urine with UTI. The presence of virulence factors (VFs), islands of pathogenicity (PAIs), ESBL cefotaxime type (CTX-M) and phylogenetic classification (A, B1, B2, C, D, E and F) were investigated by PCR. The analysis of the genetic variability of *E. coli* from blood was performed by the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) and the epidemiological and demographic data were obtained through the analysis of medical records and laboratory tests. The *fimH* gene was the most prevalent in all clinical materials. *E. coli* strains isolated from blood and liquid/secretion showed a statistically higher prevalence for *fimH* and *papC*, as well as for serum resistance related genes (*traT*, *iss* and *ompT*) compared to urinary samples. Unlike the K5 capsule, it was more prevalent in urinary samples. In general, *E. coli* from urine of outpatients carried significantly higher prevalence of VF than *E. coli* strains isolated from urine of inpatients. The prevalence of PAIs in the different clinical materials was similar, except for PAI IV536, which was higher in the blood than in *E. coli* from inpatients urine. Filogroup B2 was the most prevalent, followed by B1 for blood and inpatients urine, and E for liquid/secretion and outpatients urine. Filogroup A was statistically more prevalent in urinary *E. coli* samples. The B2 isolates showed the highest prevalence of FVs and PAIs. Eight (16.7%) of the *E. coli* from blood were characterized as producing CTBL-M ESBL, with CTX-M-15 being the most prevalent. Genetic variability analysis identified two clonal lineages and several unrelated blood isolates. Of the patients with *E. coli* bloodstream infection, 50% were secondary to urinary tract infection and 12.5% were secondary to abdominal diseases, and the mortality associated with *E. coli* bacteremia was 33.3%. In conclusion, ExPEC has a variety of virulence determinants involved in the establishment of the infection, and commonly presents resistance to multiple drugs, implying the severity of the infection. The knowledge of determinant factors, such as pathogenicity and epidemiological data of the infectious process, are important information for the development of prevention strategies and for the management and treatment of patients with extraintestinal *E. coli* infection.

**Keywords:** ExPEC. Virulence Determinants. Phylogenetic Classification. ESBL. CTXM-15.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figure 1</b> –ERIC-PCR molecular fingerprint profiles of 48 <i>Escherichia coli</i> bloodstream infection, virulence determinants and antimicrobial resistance profile. ....	66
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Genes codificadores de enzimas ESBL-CTXM.....	39
<b>Tabela 2</b> – Genes pesquisados para classificação filogenética .....	40
<b>Tabela 3</b> – Genes codificadores de fatores de virulência.....	40
<b>Tabela 4</b> – Genes codificadores de Ilhas de patogenicidade .....	41

### Artigo I

<b>Table 1</b> – Prevalence of virulence factors and pathogenicity islands in different clinical materials .....	48
<b>Table 2</b> – Comparison of virulence factors and phylogenetic group between urine samples and blood and liquid/secretion.....	49
<b>Table 3</b> – Phylogenetic classification of the different clinical materials.....	50

### Artigo II

<b>Table 1</b> – Characteristics of patients with <i>Escherichia coli</i> bacteremia .....	63
<b>Table 2</b> – Prevalence of virulence factors, pathogenicity islands of 48 blood <i>Escherichia coli</i> isolates, 2015-2018 .....	65
<b>Table 3</b> – Phylogenetic group relation with virulence factors and pathogenicity islands of 48 blood <i>Escherichia coli</i> isolates, 2015- 2018 .....	67
<b>Table 4</b> – Comparison of virulence factors, pathogenicity islands and resistance profile between two clonal groups .....	68
<b>Table 5</b> – Phylogenetic classification among isolates belonging to clonal groups .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana
CAM	Complexo de Ataque a Membrana
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DAF	Fator de Aceleração de Decaimento
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR</i>
ESBL	Extended-spectrum $\beta$ -lactamase
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
FV	Fator de Virulência
IPEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Intestinal
ITU	Infecção do Trato Urinário
NMEC	<i>Escherichia coli</i> associada à meningite neonatal
OMPs	Proteínas da Membrana Externa
PAI	Ilha de patogenicidade
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de sepse
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TLR-4	Receptores <i>toll-like</i> 4
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
TSB	Caldo de Soja e Trypticaseína
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
1.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	12
1.2	CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA	14
1.3	FATORES DE VIRULÊNCIA	15
1.3.1	Adesinas	15
1.3.2	Toxinas	18
1.3.3	Sistemas de aquisição de ferro	21
1.3.4	Invasinas	23
1.3.5	Resistência sérica	24
1.3.6	Cápsulas polissacarídicas	26
1.4	ILHAS DE PATOGENICIDADE	27
1.5	EXPEC E INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA	29
1.6	EXPEC E RESISTÊNCIA AO ANTIMICROBIANOS	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	34
2.1	OBJETIVO GERAL	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
3.1	AMOSTRAS	35
3.2	COLETA DE DADOS DOS PACIENTES	35
3.3	TESTE DE SENSIBILIDADE	35
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA	36
3.5	DETECÇÃO DE B-LACTAMASES	36
3.6	CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA	36
3.7	FATORES DE VIRULÊNCIA	37
3.8	LHAS DE PATOGENICIDADE	37
3.9	ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAROSE	38
3.10	ERIC-PCR	38
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	42

<b>Artigo I</b> - <i>Presence of virulence factors and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolates from different clinical material.</i> .....	43
<b>Artigo II</b> - <i>Escherichia coli bloodstream infection in patients of a university hospital: virulence factors and clinical characteristics.</i> .....	58
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* é um Bacilo Gram-Negativo (BGN) que pertence à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbio facultativo e predominante na microflora intestinal humana (KÖHLER; DOBRINDT, 2011). As cepas de *E. coli* colonizam o trato gastrointestinal da criança dentro de horas após o nascimento e permanecem de forma assintomática em benefício mútuo com o hospedeiro (RUSSO; JOHNSON, 2003). No entanto, vários clones apresentam fatores de virulência específicos que aumentam sua capacidade de adaptação a novos nichos e permitem que causem um amplo espectro de doenças (CLERMONT et al., 2011; STENUTZ; WEINTRAUB; WIDMALM, 2006).

*E. coli* é uma espécie geneticamente diversa que compreende isolados intestinais comensais não patogênicos e isolados responsáveis por infecções intestinais e extraintestinais (DALE; WOODFORD, 2015; VILA et al., 2016). As cepas comensais geralmente não possuem marcadores de virulência específicos. No entanto, podem participar de infecções extraintestinais quando há um fator agravante, como um corpo estranho (por exemplo, cateter urinário), comprometimento do hospedeiro (por exemplo, anormalidades anatômicas ou funcionais locais, como obstrução urinária ou do trato biliar ou imunocomprometimento) ou um inóculo alto de espécies bacterianas (como contaminação fecal da cavidade peritoneal) (RUSSO; JOHNSON, 2003; VILA et al., 2016).

Isolados de *E. coli* capazes de causar infecção intestinal são classificados em *E. coli* diarreiogênica, que também pode ser designada como *E. coli* Patogênica Intestinal (IPEC) e suas variantes como, *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) (KÖHLER; DOBRINDT, 2011). *E. coli* diarreiogênicas causam síndromes diarreicas que variam na apresentação clínica e na patogênese, de acordo com o perfil de virulência do isolado. Estas diferenças servem de base para a classificação das cepas em sub-patótipos (VILA et al., 2016). Os isolados de infecções fora do trato intestinal, por exemplo, *E. coli* Uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* causadora de

sepsis (SEPEC) foram agrupadas como *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

ExPEC tem a capacidade de causar doença em múltiplos locais anatômicos e são, frequentemente, encontradas na microbiota intestinal. Embora a aquisição de um isolado de ExPEC pelo hospedeiro seja um pré-requisito para a infecção subsequente, o fator determinante da infecção é a invasão de sítios extraintestinais, que normalmente são estéreis (RUSSO; JOHNSON, 2000, 2003). As linhagens de ExPEC possuem genes que codificam diversos fatores de virulência, possibilitando que causem infecções extraintestinais, tanto em hospedeiros saudáveis quanto imunocomprometidos (KÖHLER; DOBRINDT, 2011; RUSSO; JOHNSON, 2003). Esses genes de virulência são, na maior parte, distintos daqueles que permitem que as cepas patogênicas intestinais causem infecções. A partir de uma perspectiva de patogênese, esse é um desenvolvimento evolutivo lógico, uma vez que o ambiente do hospedeiro e os mecanismos de defesa associados diferem substancialmente, dentro e fora do trato gastrointestinal (RUSSO; JOHNSON, 2003; VILA et al., 2016).

Em geral, os diferentes patótipos não podem ser identificados com base apenas em critérios bioquímicos pois, na maioria dos casos, são indistinguíveis de *E. coli* não patogênicas, levando a uma abordagem inadequada na discriminação das cepas comensais e ExPEC, ou mesmo, entre os subtipos de ExPEC (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007). Uma forma de diferenciar os isolados de *E. coli* é através da análise dos sorogrupos somáticos, capsulares e flagelares (O: K: H). Esses antígenos não são associados aleatoriamente a cepas de *E. coli* e permitem a diferenciação de grupos de isolados importantes. Por muito tempo foi a característica bacteriana mais utilizada para a identificação das variantes de IPEC, pois a maioria dos clones patogênicos pertence a um número limitado de sorotipos O: H reconhecidos (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; STENUTZ; WEINTRAUB; WIDMALM, 2006). Isso também vale para ExPEC, onde linhagens altamente virulentas, com fenótipos epidemiologicamente ligados à doença, podem ser alocadas a um número limitado de sorogrupos O e conjuntos de genes de virulência (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA

Whittam et al. (1983) no início dos anos 80, revelaram a existência de subestruturas genéticas em *E. coli*. Estudos posteriores confirmaram a presença de uma extensa subestrutura na espécie. Após a descoberta desta subestrutura percebeu-se que as cepas pertencentes aos diferentes filo-grupos de *E. coli* não eram distribuídas aleatoriamente em relação ao seu local de isolamento. De acordo com a estrutura genética, classificou-se *E. coli* em 8 filo grupos: A, B1, B2, C, D, E, F e um outro filo grupo denominado de *Escherichia* clado I (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; CLERMONT et al., 2013).

Os grupos A e B1 são considerados grupos irmãos, assim como o grupo B2 e F. O grupo C está intimamente relacionado com o grupo B1, porém são distintos (CLERMONT et al., 2011). O filogrupo B2 é considerado por alguns pesquisadores como representante da linhagem ancestral de *E. coli* (GORDON et al., 2008). As cepas dos filogrupos diferem em suas características fenotípicas, incluindo a capacidade de utilizar diferentes açúcares, perfis de resistência a antibióticos e na taxa de crescimento em diferentes temperaturas (GORDON, 2004). Diferenças também são encontradas no tamanho do genoma, as cepas A e B1 possuem genomas menores que as cepas B2 e D, assim como a distribuição dos genes que definem a capacidade de uma linhagem de causar doença extraintestinal é distinta entre os grupos (JOHNSON; STELL, 2000).

Geralmente, *E. coli* comensais humanas originam-se dos grupos filogenéticos A e B1 e, tipicamente, não possuem os determinantes especializados de virulência encontrados em *E. coli* patogênicas que causam doenças intestinais ou extraintestinais. No entanto, a maioria dos isolados de ExPEC são encontrados nos grupos filogenéticos B2 e D e possuem vários genes de virulência que permitem induzir infecções extraintestinais em hospedeiros imunocomprometidos e saudáveis. A maioria dos fatores de virulência presentes em ExPEC são distintos daqueles encontrados em IPEC (CLERMONT et al., 2013; JOHNSON; STELL, 2000; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

### 1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência (FVs) estão associados com a patogenicidade de ExPEC, aumentam a capacidade de causar infecções sistêmicas e, caracteristicamente, não são frequentes em linhagens comensais (ANANIAS; YANO, 2008; DALE; WOODFORD, 2015). FVs são codificados no cromossomo bacteriano e geralmente estão localizados dentro de ilhas de patogenicidade (PAIs), ou em plasmídeos. FVs compreendem diversas adesinas, toxinas, cápsula polissacarídica, sideróforos ou sistemas de aquisição de ferro, mecanismos de resistência ao soro e invasinas. Esses FVs facilitam a colonização e a invasão das superfícies do hospedeiro, ajudam a escapar e a interromper os mecanismos de defesa do hospedeiro, causam injúria celular e tecidual e estimulam uma resposta inflamatória nociva, levando à doença clínica (DALE; WOODFORD, 2015; MORA-RILLO et al., 2015).

#### 1.3.1 Adesinas

A ligação de bactérias a células hospedeiras específicas é o primeiro passo para iniciar a infecção por *E. coli* patogênica. Para isso, isolados de *E. coli* expressam uma ampla variedade de adesinas na superfície, responsáveis pela ligação específica a moléculas estruturais ou funcionais associadas à membrana celular (KLINE et al., 2009). A ligação nas células-alvo do hospedeiro permite aos patógenos bacterianos entéricos e do trato urinário resistir ao peristaltismo e à micção. As adesinas, além de promoverem a adesão bacteriana às células alvo do hospedeiro, atuam intrinsecamente como moléculas de sinalização (HAYWARD et al., 2006) e diferentemente de outros FVs, estão presentes em quase todos os membros da espécie (JOHNSON; STELL, 2000).

Duguid et al. (1954), descreveram através da microscopia eletrônica, apêndices visíveis responsáveis pela aglutinação de eritrócitos em algumas cepas de *E. coli*, denominando-os de “fimbrias” (= fio, franja ou fibra em latim). Pelo menos três classes gerais diferentes de adesinas de *E. coli* podem ser definidas: diferentes apêndices, como fimbrias, fibrilas e curli, a família afimbrial (Afa) e proteínas específicas da membrana externa (OMPs) (MAINIL, 2013).

As fímbrias do tipo 1 (Fim) e pili P (Pap), associados à pielonefrite, são bem caracterizadas como adesinas de UPEC (BOUCKAERT et al., 2005). Os isolados de UPEC frequentemente possuem determinantes para ambas as adesinas que são ativadas/desativadas, em resposta ao ambiente local, por meio de uma comunicação regulamentada entre os operons *fim* e *pap* (HOLDEN et al., 2006; XIA et al., 2000). A ligação específica é assegurada pela aderência fimbrial a receptores de superfície celular distintos. As fímbrias tipo 1, ligam-se a glicoproteínas  $\alpha$ -D-manosiladas das células uroepiteliais, como as uroplaquinas, através da adesina fimbrial H (FimH) e representam um mecanismo chave na adesão de ExPEC no epitélio uretral (KOREA; GHIGO; BELOIN, 2011). No entanto, FimH reconhece muitas glicoproteínas que transportam uma ou mais estruturas de *N-linked high-mannose*. O bloqueio da interação, entre FimH e receptores, mostrou dificultar a adesão bacteriana ao uroepitélio da bexiga e, portanto, à infecção (BOUCKAERT et al., 2005).

As fímbrias P são expressas por UPEC e estão fortemente associadas à capacidade das bactérias colonizarem o rim e causarem pielonefrite (EMODY; KERÉNYI; NAGY, 2003). As fímbrias P, foram assim denominadas devido à ligação com receptores Gal $\alpha$ -4Gal $\beta$  glicolipídicos dos glóbulos vermelhos. Esses receptores são membros do grupo sanguíneo P, o qual possui vários antígenos (como P1, P e Pk) na superfície dos eritrócitos, dependendo do grupo sanguíneo do indivíduo. As fímbrias P induzem a aglutinação de eritrócitos de indivíduos com grupo sanguíneo P1, mas não aglutinam os eritrócitos do grupo sanguíneo P. Os receptores Gal $\alpha$ -4Gal $\beta$  glicolipídicos são expressos abundantemente nas células uroepiteliais do trato urinário humano (WULLT, 2003).

O contato molecular entre a superfície da mucosa (receptor) e o patógeno (fímbria P) induz a sinalização transmembrana independente do lipopolissacarídeo (LPS), ativando as células epiteliais e a produção de interleucina (IL-6 e IL-8) promovendo o desenvolvimento de inflamação local (EMODY; KERÉNYI; NAGY, 2003; WULLT, 2003). Do mesmo modo, há evidência de que a ligação à fímbria P, provoca inflamação em um cluster de diferenciação número 14 (CD-14) de maneira independente, provavelmente por associação aos receptores *toll-like* 4 (TLR-4), ou seja, utiliza o TLR-4 como um co-receptor para a ativação celular (FISCHER et al., 2006; FRENDEUS et al., 2001).

Duguid et al. (1954) já haviam observado que várias cepas de *E. coli* não produtoras do apêndice também podem causar a aglutinação dos eritrócitos. Essas hemaglutininas formam, de fato, uma família de diferentes adesinas geneticamente relacionadas, à família de adesinas afimbriais (Afa)(MAINIL, 2013; SERVIN, 2014).

Os grupos de genes *afa* codificam as adesinas Afas que são expressas por UPEC e diarreicas associadas. Esses clusters gênicos são responsáveis pela biossíntese das adesinas Afa pertencentes à família de adesinas Afa/Dr e pela biossíntese de invasinas. (SERVIN, 2005, 2014).

Adesinas Afa são um grupo heterogêneo de proteínas, muitas dessas adesinas medeiam a aglutinação resistente a manose de eritrócitos humanos expressando o antígeno Dr do grupo sanguíneo Cromer no fator de aceleração de decaimento (DAF ou CD55) e são, conseqüentemente, chamadas de adesinas Afa/Dr (LE BOUGUÉNEC, 2005; SERVIN, 2005, 2014). O DAF é uma das proteínas da membrana celular que regula a cascata do complemento e protege as células eucarióticas dos danos mediados pelo complemento prevenindo a formação e acelerando o decaimento das convertases C3 (VAN LOY et al., 2002).

A interação AfaE-DAF não permite apenas a ligação das bactérias às células epiteliais do hospedeiro, mas também bloqueia ou induz eventos celulares que desempenham papéis-chave nos processos fisiopatológicos das infecções causadas por *E. coli* produtoras de Afa/Dr, como o aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe I associadas a moléculas A (MICA), uma molécula central na resposta imune inata que também desencadeia estímulos pró-inflamatórios (ANDERSON et al., 2004; SERVIN, 2014).

Isolados de *E. coli* patogênica que expressam Afa são frequentemente associadas a diarreia persistente e infecções extraintestinais crônicas ou recorrentes. Uma explicação para o desenvolvimento de tais infecções é que, depois de entrarem nas células epiteliais, os isolados que expressam Afa podem criar nichos especiais que permitem que as bactérias persistam intracelularmente. Pelo menos dois produtos Afa (AfaD e AfaE) contribuem para diferentes processos de internalização, demonstrando a complexidade das interações entre bactérias afa-expressoras e células epiteliais (LE BOUGUÉNEC, 2005).

As adesinas fimbriais S, codificadas pelo gene *sfa*, reconhecem e se ligam a moléculas receptoras na superfície celular que contêm ácido  $\alpha$ -siálico presentes em eritrócitos e células tubulares renais (KORHONEN; VAISANEN-RHEN; RHEN, 1984;

OTT et al., 1988) e estão mais frequentemente associadas a NMEC e UPEC do que isolados de sangue (FRÖMMEL et al., 2013; WANG; WEN; KIM, 2004). As adesinas fimbriais S, expressas por ExPEC, são codificadas por um operon que contém nove genes, localizado em PAIs no cromossomo bacteriano, como por exemplo PAI III<sub>536</sub> (BALSALOBRE et al., 2003; DOBRINDIT et al., 2001).

As fímbrias S são comuns entre os uropatógenos, mas são menos frequentes que as fímbrias tipo 1 ou P. A ligação fimbrial S é inibida pela proteína Tamm-Horsfall, uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais dos túbulos distais, que pode reduzir sua força como fator de virulência no rim (LÜTHJE; BRAUNER, 2014)

A contribuição da fímbria S na patogênese da meningite neonatal ainda não está totalmente clara, entretanto, a prevalência nas amostras de meningite neonatal é relevante. No estudo de Johnson et al. (2002), a prevalência da fímbria S nas amostras de *E. coli* de meningite neonatal foi de 61%.

As fímbrias S, que se ligam nos terminais NeuAc $\alpha$ 2 3-galactose presentes nas glicoproteínas, foram implicadas como um dos fatores microbianos envolvidos na patogênese da meningite neonatal por *E. coli*, como por exemplo ligando -se as células endoteliais microvasculares cerebrais (WANG; WEN; KIM, 2004). Além disso, estudos utilizando isolados de *E. coli* mutantes indicaram que a fímbria S contribui para a ligação ao plasminogênio e subsequente geração de plasmina. A plasmina promove a degradação da matriz extracelular da barreira hematoencefálica, promovendo assim a penetração bacteriana através das membranas basais (HUANG; STINS; KIM, 2000).

Há evidências de que as adesinas auxiliam na formação do biofilme pela UPEC (ZAMANI; SALEHZADEH, 2018). A formação de biofilme promove a persistência bacteriana no trato urinário, protegendo as bactérias do efeito de eliminação das forças hidrodinâmicas, agentes antibacterianos e mecanismos de defesa do hospedeiro. A avaliação dos fatores que contribuem para a formação do biofilme pode ser útil para conceber novas soluções terapêuticas para tratar essas infecções (FERACO et al., 2016).

### 1.3.2 Toxinas

A hemolisina A (HlyA) foi identificada e nomeada por sua propriedade de lisar os glóbulos vermelhos, no entanto, também tem atividade citotóxica contra uma

variedade de espécies e tipos de células nucleadas, incluindo células imunes, endoteliais e epiteliais no trato urinário (RISTOW; WELCH, 2016). Das toxinas UPEC conhecidas, HlyA, uma toxina formadora de poros presente em aproximadamente 50% dos isolados de UPEC, desempenha um papel significativo na patogênese da infecção do trato urinário (ITU) (MURTHY et al., 2018). A patogênese da hemolisina está relacionada com a morte das células do epitélio do hospedeiro, como por exemplo as células uroepiteliais, assim como está envolvida na morte celular de monócitos, linfócitos e neutrófilos, (BHAKDI et al., 1989; HUNSTAD et al., 2005; JONAS et al., 1993).

Tais efeitos podem contribuir para a colonização do hospedeiro por vários meios. A morte das células epiteliais expõe o tecido subjacente à bactéria. (DHAKAL, BIJAYA K.; MULVEY, 2011; MURTHY et al., 2018). A HlyA estimula a atividade de proteases de soro e caspases, que então medeiam a degradação da paxilina (importante para estabilizar os contatos célula-célula) e induzem a apoptose, respectivamente. Esta atividade proteolítica indireta também pode contribuir para a ação antiinflamatória proposta da HlyA (DHAKAL, BIJAYA K.; MULVEY, 2011). Enquanto a esfoliação remove patógenos do trato urinário, também promove a disseminação de bactérias e facilita a entrada bacteriana em células menos expostas e diferenciadas, formando reservatórios dormentes para infecções recorrentes (BERRY; KLUMPP; SCHAEFFER, 2009).

Apesar do soro conferir uma proteção parcial contra atividade tóxica da hemolisina, o ataque e a morte rápida de macrófagos implica na diminuição do recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, além do ataque sobre os próprios neutrófilos, sugerindo um papel protetor da HlyA contra a morte mediada por neutrófilos (BHAKDI et al., 1989).

Mais recentemente, GUR et al. (2013) sugeriram uma interação de HlyA com células *natural killer* (NK) na bexiga urinária. Após a ligação bacteriana às células NK através de fímbrias tipo 1, as células NK são mortas por HlyA. Como as células NK promovem a secreção de TNF- $\alpha$  em resposta à infecção, essa ação do HlyA suprime a resposta pró-inflamatória a UPEC. A HlyA também pode reduzir diretamente a produção de citocinas em várias células imunes (BHUSHAN et al., 2011) e epiteliais (HILBERT et al., 2012).

Hemolisina F (HlyF) é codificada pelo plasmídeo ColV e foi demonstrado ser um marcador epidemiológico de *E. coli* patogênica aviária (APEC) (AHMED;

SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2013; DISSANAYAKE; OCTAVIA; LAN, 2014) e NMEC (KACZMAREK; BUDZYŃSKA; GOSPODAREK, 2014). Apesar da função de hemolisina ser atribuída ao HlyF, pouco se sabe sobre sua contribuição exata à virulência (MURASE et al., 2016).

Um estudo recente demonstrou que cepas de *E. coli* que expressavam HlyF induzem a autofagia de células eucarióticas e este fenótipo coincide com uma maior expressão de vesículas de membrana externa que estão associadas a liberação de toxinas. O estudo também demonstrou que o gene *hlyF* foi expresso em infecções extraintestinais e que possui um papel importante na virulência de *ExPEC* em um modelo de colibacilose de frango (MURASE et al., 2016).

Fatores citotóxicos necrosantes 1 e 2 (CNF1 e CNF2) são proteínas de 110 a 115 kDa que possuem um domínio catalítico conservado composto de uma tríade de histidina, citina e valina e são codificados por genes agrupados em PAIs. Após a secreção bacteriana, o CNF1 é fornecido às células hospedeiras através das vesículas da membrana externa e entra nas células por endocitose mediada por receptores (SMITH et al., 2015). Após endocitose, a acidificação endossômica e a clivagem do CNF1 conduzem à translocação da parte ativa da toxina para o citoplasma, onde desamidam um resíduo específico de glutamina nas proteínas Rho GTPase (GALL-MAS et al., 2018; KNUST; SCHMIDT, 2010). As GTPases da família Rho atuam como interruptores moleculares nas vias de transdução de sinal que envolvem componentes do citoesqueleto, como actina, miosina e microtúbulos (GALL-MAS et al., 2018; VILLALONGA; RIDLEY, 2006).

Rho GTPases controlam uma ampla gama de processos celulares, porém são mais reconhecidas por seu papel na regulação da dinâmica e organização do citoesqueleto de actina. Conseqüentemente, o CNF1 induz rearranjos do citoesqueleto de actina nas células alvo, levando a alterações morfológicas e funcionais. Esses rearranjos podem facilitar a internalização bacteriana em células hospedeiras, e evidências substanciais sustentam que o CNF1 contribui para o potencial de invasão de *E. coli* patogênica pela manipulação das barreiras epiteliais e endoteliais (GALL-MAS et al., 2018; KNUST; SCHMIDT, 2010). Além disso, CNF1 e CNF2 podem levar ao aumento da célula, multinucleação e necrose celular (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

*E. coli* portadores do gene *cnf1* foram isoladas de crianças com diarreia, mas são mais frequentemente associadas a condições extraintestinais, principalmente a

infecções do trato urinário, presente em torno de 40% dos isolados de UPEC, e com menos frequência em bacteremia e meningite neonatal (SMITH et al., 2015; WANG; KIM, 2013). Esse gene também já foi encontrado em infecções da pele e dos tecidos moles, com uma prevalência de 32%, sugerindo que a toxina pode funcionar como um fator de virulência em diversos nichos do hospedeiro (PETKOVŠEK et al., 2009).

### 1.3.3 Sistemas de Aquisição de Ferro

O ferro é um elemento essencial em quase todos os organismos. Está contido em muitas enzimas redox do metabolismo intermediário e nas cadeias de transporte de elétrons ligadas à membrana dos sistemas respiratórios e da fotossíntese. O  $\text{Fe}^{3+}$  é quase insolúvel e é tóxico devido a formação de radicais de oxigênio que danificam o DNA, lipídios e proteínas, por isso está ligado, principalmente, a proteínas como transferrina, lactoferrina, hemoglobina, haptoglobina, hemopexina e lipocalina (RATLEDGE et al., 2007; WILSON, 2017).

As bactérias lidam com a deficiência de ferro através da secreção de pequenas moléculas sequestradoras de ferro chamadas sideróforos. São pequenas moléculas com peso molecular entre 500-1500 daltons e de alta afinidade pelo  $\text{Fe}^{3+}$  (HIDER; KONG, 2010). Muitos sideróforos são importantes fatores de virulência, particularmente em patógenos que codificam múltiplos sideróforos devido à aquisição por transferência horizontal de genes. Desta forma, cepas capazes de superproduzir sideróforos são consideradas hipervirulentas, enquanto cepas incapazes de produzir ou secretar sideróforos apresentam diminuição da virulência e da aptidão durante a infecção e colonização (HOLDEN; BACHMAN, 2015).

Após sequestro do ferro extracelular, os complexos sideróforos férricos resultantes são capturados por receptores de membrana externa. Para a internalização e transporte desses sideróforos, a bactéria utiliza uma proteína de ligação periplasmática, um transportador ABC da membrana interna e o complexo TonB. O complexo TonB controla a transferência do sideróforo do receptor da membrana externa para a proteína de ligação do periplasma, e o transportador ABC fornece a entrada citoplasmática (BRAUN; BRAUN, 2002; BRAUN; HANTKE, 2011; ZHENG; NOLAN, 2012).

Apesar das diferenças químicas entre estes sideróforos, cada sistema é composto por componentes que medeiam passos específicos necessários para a absorção de ferro férrico, que incluem a síntese, exportação, recepção do sideróforo férrico na superfície da membrana externa, internalização e liberação de ferro no citoplasma (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011)

Três sistemas de sideróforos são mais prevalentes em ExPEC, o sistema de aerobactina, caracterizado pelo receptor *lutA*, o sistema yersiniabactina, sintetizado por genes localizados em uma ilha de alta patogenicidade e caracterizado pelo receptor *FyuA* e o sistema salmochelina, caracterizado pelo receptor de sideróforos *IroN* (NÈGRE et al., 2004).

Moléculas de salmochelina foram descobertas em *Salmonella entérica* (HANTKE et al., 2003). O *locus* de *iroA* responsável pela produção de salmochelina foi identificado primeiramente em *Salmonella spp.* Este locus compreende duas regiões convergentes, uma região contém os genes *iroBCDE* e a outra contém o gene *iroN*, codificando o receptor de salmochelina (BÄUMLER et al., 1998; GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011). O sideróforo reconhecido por *IroN* é composto de porções de 2,3-di-hidroxibenzoilserina ligadas à glicose (HANTKE et al., 2003). A maioria das cepas ExPEC também pode usar heme como fonte de ferro expressando um receptor de membrana externa específico codificado pelo gene *chuA*. (MARTIN et al., 2017; NÈGRE et al., 2004).

Aerobactina foi isolada pela primeira vez a partir de *Aerobacter aerogenes* cultivada em meio com pouco ferro (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011; GIBSON; MAGRATH, 1969). A biossíntese da aerobactina é dirigida por enzimas codificadas pelos genes *iucABCD* (quelato de absorção de ferro). A proteína de transporte da membrana externa é codificada pelo gene *iutA*. Os genes são codificados em plasmídeos, geralmente em plasmídeos ColV, ou no cromossomo (RON, 2010). O transporte de aerobactina férrica através da membrana citoplasmática é mediado pelo sistema de transporte *FhuBCD* de ferricromo e outros sideróforos férrico-hidroxamato. O fornecimento de ferro via aerobactina férrica contribui para virulência de patógenos de *E. coli* (BRAUN, 2003; GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011)

Outro sistema importante para aquisição e transporte de  $Fe^{3+}$  é o sideróforo yersiniabactina encontrado primeiramente em espécies de *Yersinia*. Este sistema é frequentemente codificado em uma ilha de alta patogenicidade encontrada em ExPEC e está presente em aproximadamente 70% dos isolados de sangue (MORA-

RILLO et al., 2015). Também é frequentemente encontrado em amostras de líquido cefalorraquidiano, no estudo de Bonacorsi et al. (2006), 96% dos isolados de *E. coli* de meningite neonatal foram positivos para *fyuA* e também apresentaram alta prevalência para *iutA* (84%) e *iroN* (71%). Na urina, este sistema desempenha um papel na formação de biofilme além da função de absorção de ferro (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011; SCHUBERT; RAKIN; HEESEMANN, 2004).

#### 1.3.4 Invasina

A presença do gene *ibeA* (invasão do endotélio cerebral A) foi descrita e identificada inicialmente em NMEC (CIEZA et al., 2015; HUANG et al., 2001). O gene *ibeA* é mais prevalente em cepas de *E. coli* causando infecções precoces em recém-nascidos humanos, sugerindo que o IbeA pode ter um papel importante na etapa inicial da meningite e sepse neonatal. Segundo Johnson et al. (2002), os isolados NMEC apresentaram uma prevalência 33%, assim como Ewers et al. (2007) encontrou uma prevalência de 38.7% em NMEC. Em isolados de sangue e urina a frequência de *ibeA* é menor (EWERS et al., 2007; KOGA et al., 2014).

IbeA facilita a penetração de *E. coli* nas células do endotélio microvascular do cérebro humano que constituem a barreira hematoencefálica através de uma interação ligante-receptor (MENDU et al., 2008). A vimentina, um marcador mesenquimal, foi identificada como uma proteína de ligação a IbeA que está presente na superfície das células da barreira hematoencefálica (ZOU; HE; HUANG, 2006). A invasão de *E. coli* através da barreira hematoencefálica é específica para o endotélio cerebral e é multifatorial, requer vários genes envolvidos na ligação, invasão e sobrevivência intracelular (HUANG et al., 2001).

IbeA já foi relatado em isolados de APEC altamente patogênica e a ausência de *ibeA* foi associada à redução da mortalidade em galinhas (GERMON et al., 2005) e em AIEC, contribuindo na invasão das células intestinais e na sobrevivência dentro dos macrófagos (CIEZA et al., 2015).

Existe pouca informação sobre os mecanismos moleculares que medeiam as interações do IbeA com as células hospedeiras. No entanto, a IbeA é descrita como uma proteína da membrana externa de 50 kDa, com sete domínios transmembranares (MENDU et al., 2008).

### 1.3.5 Resistência Sérica

A capacidade de sobreviver à ação bactericida do soro é essencial para o acesso e sobrevivência de ExPEC na corrente sanguínea. A evasão das defesas inatas presentes no soro, incluindo peptídeos antimicrobianos e do complemento, envolve múltiplos fatores. Mecanismos de resistência sérica utilizados por *E. coli* incluem a produção de cápsulas de polissacarídeos extracelulares protetoras e a expressão de fatores que inibem ou interferem na cascata do complemento (MIAJLOVIC; SMITH, 2014). A presença de *E. coli* na corrente sanguínea pode resultar na indução de uma vigorosa resposta inflamatória do hospedeiro, levando à sepse, que está associada à alta morbidade e mortalidade (RUSSO; JOHNSON, 2003).

O soro contém mais de trinta proteínas do sistema complemento, um componente crucial da resposta imune inata do hospedeiro que também pode iniciar a resposta adaptativa (SARMA; WARD, 2012). A deposição de fatores do complemento na superfície bacteriana ativa a cascata do complemento e resulta na formação do complexo de ataque à membrana (CAM). Esse complexo forma poros transmembranares em bactérias suscetíveis, levando à morte bacteriana (SARMA; WARD, 2012).

Vários fatores que impedem a ação do sistema complemento são codificados por plasmídeos, e isso tem implicações na transmissibilidade desses genes, levando a bactérias que exibem resistência sérica aumentada (MIAJLOVIC; SMITH, 2014), além disso, esses genes são frequentemente encontrados em *E. coli* de sangue, com prevalências que variam de 50 a 85% (BOZCAL et al., 2018; MIAJLOVIC et al., 2016).

O gene responsável pelo aumento da resistência aos efeitos líticos do soro, *iss* (*increased serum survival*), foi descoberto em 1979, é codificado pelo plasmídeo ColV (BINNS; DAVIES; HARDY, 1979). *Iss* é uma proteína de membrana externa frequentemente expresso por cepas virulentas, contribuindo para a resistência do soro através da restrição da deposição de C3 na membrana exterior da bactéria, bloqueando assim o CAM (BINNS; MAYDEN; LEVINE, 1982; XU; LI; FAN, 2008; MIAJLOVIC; SMITH, 2014).

TraT também é uma lipoproteína da membrana externa codificada por alguns plasmídeos ColV e plasmídeos do grupo F de incompatibilidade (JOHNSON, 1991;

MIAJLOVIC; SMITH, 2014) A expressão de TraT tem sido associada ao aumento da resistência ao soro, embora o mecanismo subjacente a essa propriedade não tenha sido determinado conclusivamente (JOHNSON, 1991). Estudos sugeriram que o TraT inibe estágios posteriores da atividade da CAM e a formação ou estrutura do complexo C5b6 (BINNS; MAYDEN; LEVINE, 1982). TraT também pode alterar a deposição de C3 na superfície bacteriana e afetar a permeabilidade da membrana externa (SUKUPOLVI; CONNOR, 1987).

Protease da membrana externa (OmpT) é um fator que historicamente, tem sido considerada uma protease de 'manutenção' em relação a proteínas microbianas e extracelulares endógenas. Apesar de estudos terem demonstrado que OmpT inativa os peptídeos antimicrobianos do hospedeiro (OKUNO et al., 2004; THOMASSIN et al., 2012) e que pode aumentar a colonização de *E. coli* no uroepitélio (HUI et al., 2010), sua função precisa na patogênese das infecções por *E. coli* não é clara. Atualmente, não há associação significativa da presença e expressão de OmpT com isolados clínicos específicos e cepas patogênicas de *E. coli* (PREMJANI et al., 2014).

*Colicin V (cvaC)* é um gene presente no plasmídeo ColV e é responsável pela síntese de colicina V (ColV), é uma pequena proteína, também chamada de microcina, que é exportada da célula e interrompe a formação do potencial de membrana celular necessário para a produção de energia, inibindo o crescimento celular de outras bactérias, reduzindo assim a competição por nutrientes essenciais sob escassez ou condição de estresse. (GÉRARD; PRADEL; WU, 2005; JAKES; CRAMER, 2012). Segundo Nedialkova et al. (2014), a produção de colicina é uma característica comum entre isolados de *E. coli* e, em média, 30% produzem uma ou mais colicinas.

Os plasmídeos ColV têm sido associados há muito tempo com a virulência e codificam características como a produção de aerobactina e resistência sérica (AZPIROZ; POEY; LAVIÑA, 2009; JOHNSON, 1991; JOHNSON et al., 2006). No entanto, verificou-se que a produção da bacteriocina ColV, não é diretamente responsável por essa associação com a virulência. Portanto, outras características codificadas por esses plasmídeos são provavelmente responsáveis por suas contribuições à virulência. Até hoje, a natureza dessa associação não foi totalmente compreendida (JOHNSON et al., 2006).

### 1.3.6 Cápsulas Polissacarídicas

A produção de uma camada de polissacarídeo associada à superfície conhecida como cápsula é comum entre *E. coli* que causam bacteremias. A expressão da cápsula fornece uma barreira que protege a membrana externa das defesas do hospedeiro, incluindo a deposição de fatores do complemento (ABREU; BARBOSA, 2017; MIAJLOVIC; SMITH, 2014). As cápsulas, na maioria dos casos, consistem em antígeno capsular (K) (WHITFIELD, 2009).

Mais de 80 polissacarídeos capsulares sorologicamente e quimicamente únicos podem ser produzidos por *E. coli*. As cápsulas foram classificadas em quatro grupos (1 a 4) com base em características que incluem a organização genética e a regulação dos *locus* relevantes e os mecanismos de biossíntese e montagem (WHITFIELD, 2009; YANG et al., 2018).

As cápsulas do grupo 1 e 4 são encontradas em isolados de *E. coli* que causam infecções intestinais, incluindo EPEC, ETEC e EHEC (WHITFIELD, 2006, 2009). Já as cápsulas dos grupo 2 (K1, K4, K5, K7, K12) e 3 (K2, K3, K10, K11, K19, K54) são encontradas em isolados clinicamente prevalentes que causam infecções extraintestinais, como meningite neonatal e isolados UPEC (RUSSO et al., 1998; WHITFIELD, 2009).

Estudos mostraram que o polissacarídeo capsular K1 é crucial para a sobrevivência de *E. coli* no sangue. A produção de cápsulas K1 predomina entre os isolados de ExPEC e podem causar altos níveis de bacteremia, levando à invasão meníngea, o que pode ser atribuído à sua capacidade de contornar os mecanismos de defesa do hospedeiro (ABREU; BARBOSA, 2017; KIM, 2016; KIM et al., 1992). Os mutantes deficientes em K1 são incapazes de causar bacteremia de alto grau e atingir a barreira hematoencefálica em um modelo de rato neonatal (KIM et al., 1992).

Assim como a cápsula K1, a cápsula K5 também está envolvida na patogênese das infecções extraintestinais, como bacteremia, ITU e meningite neonatal (BLUNDELL et al., 2009). Além disso, a cápsula K5, confere resistência tanto ao sistema imune inato como ao adaptativo humano, segundo Blundell et al. (2009), a cápsula K5 é quimicamente similar ao sulfato de heparan (presente na matriz extracelular dos mamíferos), esse mimetismo é, provavelmente, o que

contribui para a capacidade de escapar do sistema imunológico, assim, conferir alta virulência aos isolados de *E. coli*.

A cápsula K2, presente em ExPEC, também demonstrou ter um papel significativo na patogênese. O mutante K2 deficiente em cápsula é mais suscetível à atividade bactericida do soro. A complementação do mutante com os genes que codificam a cápsula K2 restaurou o fenótipo do tipo selvagem, aumentando a resistência sérica e a sobrevivência bacteriana na urina e nos rins (ABREU; BARBOSA, 2017; BUCKLES et al., 2009). A cápsula K54 do grupo 3 apresenta um importante papel nas infecções sistêmicas, atuando na resistência sérica contra a deposição do sistema complemento na membrana externa (ABREU; BARBOSA, 2017; MIAJLOVIC; SMITH, 2014; RUSSO et al., 1998).

A prevalência dos diferentes antígenos capsulares em ExPEC é bastante variável. Ananias et al. (2008), encontraram uma prevalência do gene *KpsMT II* em 81.3% dos isolados de *E. coli* de sangue, esse gene codifica entre outros antígenos capsulares, a cápsula K1 e K5 (RUSSO et al., 1998). Entretanto Bozcal et al. (2018) encontrou uma prevalência de 13.4% para o mesmo grupo capsular também em isolados de sangue. Em UPEC, Bonacorsi et al. (2006) encontraram 35% de positividade para *KpsMT II*. Em NMEC, a prevalência de *KpsMT II* foi de 98% em um estudo de Ewers et al. (2007). Skjøt-Rasmussen et al. (2012) encontraram o gene *KpsMT III* em menos de 1% dos isolados de *E. coli* de sangue.

#### 1.4 ILHAS DE PATOGENICIDADE

A perda e ganho de elementos genéticos móveis tem um papel fundamental na formação dos genomas de bactérias patogênicas. A transferência horizontal de genes é um mecanismo importante que rapidamente dissemina novos traços para os organismos receptores. Adquirir essas novas características é crucial para promover a adaptação e a sobrevivência de um patógeno no hospedeiro (CROXEN; FINLAY, 2010).

Grandes aglomerados de genes de virulência, chamados de PAIs, podem ser encontrados em plasmídeos ou integrados no cromossomo em bactérias patogênicas, porém são menos comuns em *E. coli* comensais. PAIs são geralmente acompanhadas por elementos genéticos móveis como, bacteriófagos, sequências de inserção ou transposons (CROXEN; FINLAY, 2010; HOCHHUT et al., 2006). São

elementos grandes de DNA (normalmente possuem entre 10.000 a 200.000 pares de bases ) e apresentam conteúdo de guanidina e citosina (G+C) diferente do restante do cromossomo, geralmente localizadas em regiões específicas no genoma bacteriano, associadas a genes que codificam RNA transportador (RNAt) (CROXEN; FINLAY, 2010; VIEIRA, 2009).

Muitos fatores chave de virulência estão codificados nas PAIs, como invasinas, adesinas, toxinas, sideróforos ou componentes que possibilitem a ação destes fatores, o que enfatiza sua importância na formação dos vários patótipos. A diversidade de doenças associadas às infecções por *E. coli* também é refletida pelas variedades estruturais e funcionais nas PAIs. Além disso, a maioria das cepas carregam múltiplos PAIs, por exemplo, pelo menos cinco PAIs (PAI I<sub>536</sub> a PAI V<sub>536</sub>) foram identificados no cromossomo do isolado UPEC 536 (DOBRINDT et al., 2002; HOCHHUT; DOBRINDT; HACKER, 2004).

A maioria das PAIs foram inicialmente descobertas em cepas de UPEC. As primeiras descrições dos fatores de virulência como pertencentes as PAIs em UPEC foram feitas por Hacker et al. (1990) em um isolado de *E. coli* de pielonefrite. Essa cepa de *E. coli* denominada de 536 demonstrou, a princípio, apresentar duas ilhas (PAI I<sub>536</sub> e PAI II<sub>536</sub>), a primeira continha genes para hemolisina e a segunda genes para hemolisina e fímbria P (VIEIRA, 2009).

Posteriormente, PAI III<sub>536</sub> foi encontrada em *E. coli* urinária e continha determinantes genéticos que codificavam fímbria S, sideróforo *iro* e protease TSH-like hemoglobina (HOCHHUT; DOBRINDT; HACKER, 2004). Recentemente, foi relatado o envolvimento de PAI III<sub>536</sub> e PAI I<sub>536</sub> na patogenicidade em um modelo de pneumonia por *E. coli* em ratos (PHILLIPS-HOULBRACQ et al., 2018). PAI IV<sub>536</sub> é considerada uma ilha de alta patogenicidade e está associada a síntese e transporte de yersiniabactina, um dos principais sistemas bacterianos de absorção de ferro. PAI IV<sub>536</sub> é altamente conservada entre as espécies, com homologias de 98 a 100%, entre os genes de *E. coli* (DOBRINDT et al., 2002) e é mais comum em isolados de SEPEC, UPEC e EAEC (SMATI et al., 2017). Najafi et al. (2018), relataram uma prevalência de 77% para PAI IV<sub>536</sub> em UPEC. Em *E. coli* de sangue, Koga et al. (2014) encontraram a presença da ilha em 60% dos isolados. Além disso, já foi associado a isolados resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, principalmente aos que carregam o gene *bla*<sub>CTXM-15</sub> (BIN THANI, 2018).

PAI V<sub>536</sub> contém um determinante genético que codifica uma cápsula polissacarídica (K15) e possui um papel na patogênese da ITU (HOCHHUT; DOBRINDT; HACKER, 2004; MANSON; GILMORE, 2006).

PAI I<sub>J96</sub> e PAI II<sub>J96</sub> foram relatadas em cepas de *E. coli* J96 de pielonefrite e possuem genes que codificam  $\alpha$  hemolisina, fímbria P e  $\alpha$  hemolisina, fímbria P, fator citotóxico necrotizante 1, respectivamente. PAI I<sub>CFT073</sub> e PAI II<sub>CFT073</sub> também foram relatadas primeiramente em cepas de *E. coli* CFT073 isoladas de urina, sendo que PAI I<sub>CFT073</sub> possui genes que codificam  $\alpha$  hemolisina, fímbria P e aerobactina e PAI II<sub>CFT073</sub> possui genes que codificam fímbria P e sideróforos e também já foram associadas a resistência aos betalactâmicos (BIN THANI, 2018; HOCHHUT; DOBRINDT; HACKER, 2004). PAI I<sub>CFT073</sub> e PAI II<sub>CFT073</sub> são frequentemente encontradas em UPEC, aproximadamente em 40% dos isolados, segundo Najafi et al. (2018). Em *E. coli* de sangue essa prevalência é menor (KOGA et al., 2014).

### 1.5 EXPEC E INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA

A infecção da corrente sanguínea ou bacteremia está associada à maior morbidade e mortalidade em todo o mundo e se refere ao crescimento de um microrganismo a partir de uma hemocultura obtida de um paciente com sinais clínicos de infecção e onde a contaminação foi descartada (LAUPLAND, 2013).

Estas infecções são, frequentemente, classificadas como primárias ou secundárias quando associadas à confirmação clínica ou microbiológica da infecção em um local definido do corpo. Podem ser classificadas também como infecção comunitárias, infecções hospitalares e infecção da corrente sanguínea relacionadas à assistência à saúde, quando a infecção tem início na comunidade, porém teve exposição recente ao sistema de saúde (LAUPLAND, 2013). Uma complicação grave da bacteremia é a sepse, que se caracteriza por um quadro mais avançado, no qual, a bactéria invasora é capaz de sobreviver no sangue e atingir outros órgãos, sendo normalmente secundário a ITU e doenças respiratórias (RHODES et al., 2017).

*E. coli* é frequentemente isolada de bacteremia em adultos (MORA-RILLO et al., 2015). Com base nos dados de vigilância na Europa, *E. coli* está entre os cinco patógenos mais frequentemente associados a bacteremia. (DE KRAKER et al.,

2013). Assim como, Laupland (2013) investigou a epidemiologia das infecções da corrente sanguínea em centros de vigilância da Austrália, Canadá, Dinamarca, Finlândia, Islândia, Nova Zelândia, Suécia e EUA, *E. coli* representou uma das etiologias mais comuns neste tipo de infecção. Um estudo na Inglaterra mostra que a incidência de bacteremia por *E. coli* dobrou de 2002 a 2011 com uma taxa de 18.2% de mortalidade (ABERNETHY et al., 2017, 2015) e na mesma região *E. coli* foi a causa mais comum de infecção da corrente sanguínea em hospitais pediátricos (GRAY, 2017; GRAY; OPPENHEIM; MAHIDA, 2018). Estudos na Turquia e Egito, também relatam *E. coli* como o microrganismo mais comumente relacionado a infecção da corrente sanguínea em neonatos e crianças (AYDIN TEKE et al., 2017; NOUR et al., 2017). Na Dinamarca, *E. coli* também foi o microrganismo mais frequente em infecções da corrente sanguínea em adultos (NIELSEN et al., 2014, 2016).

No Brasil, há poucos estudos sobre a prevalência de infecção da corrente sanguínea na população em geral. Segundo Pereira et al. (2013), *E. coli* foi responsável por 3,9% das infecções da corrente sanguínea em pacientes pediátricos, entretanto com uma taxa de mortalidade significativa de 21.4%. Ribas et al. (2007), relataram que 21,6% das bacteremias foram causadas por *E. coli* em um Hospital Universitário de 2000 a 2001 incluindo pacientes de todas as idades. Em 2010, Tenório et al. encontraram uma prevalência de 9.1% em também em pacientes de todas as idades de 2005 a 2006. No Hospital Universitário de Londrina, a média da prevalência de *E. coli* isolados da corrente sanguínea nos últimos 4 anos (2015-2018) foi de 4.7% (Dado não publicado).

Isolados de *E. coli* que causam bacteremia e sepse sobrevivem ao sistema imunológico do hospedeiro por possuírem múltiplos fatores de virulência (PETTERSEN et al., 2016), Quando a infecção ocorre, a defesa imunológica do hospedeiro responde para eliminar os agentes infecciosos. A progressão da infecção está associada à capacidade bacteriana de sobreviver à atividade bactericida do soro, principalmente por causa da atividade do complemento (OWRANGI et al., 2018; RON, 2010). No entanto, as condições do hospedeiro podem superar as propriedades bacterianas na sepse (LEFORT et al., 2011; OWRANGI et al., 2018).

Os tecidos e o sangue dos mamíferos são depletados de ferro livre, já que todo o ferro está fortemente ligado a proteínas como a transferrina, desta forma, as bactérias precisam codificar um ou mais sistemas eficientes de ligação de ferro para

sobreviver. A internalização por células hospedeiras também é importante para virulência e proteção contra a fagocitose, colonização, persistência intracelular e dano celular, porém, não é absolutamente obrigatório (OWRANGI et al., 2018; RON, 2010).

A infecção da corrente sanguínea por ExPEC ocorre principalmente em decorrência de uma infecção primária, como por exemplo a ITU, um processo chamado de urossepse (WAGENLEHNERA; TANDOGDUB; JOHANSEN, 2017). Para a ocorrência da urossepse, a UPEC infecta a bexiga de pacientes suscetíveis e forma estruturas de biofilme ou invade o uroepitélio para estabelecer comunidades bacterianas intracelulares (CBIs) (MCNALLY et al., 2013; WAGENLEHNERA; TANDOGDUB; JOHANSEN, 2017). A partir, deste evento a UPEC pode escapar de biofilmes ou CBIs e ascender no trato urinário para chegar ao rim. Uma vez no rim, o acesso ao sistema circulatório pode ocorrer através do sistema de troca sanguíneo, nos glomérulos renais, para estabelecer bacteremia (MCNALLY et al., 2013).

Estudos demonstraram que o acesso de ExPEC à corrente sanguínea pode ocorrer através da translocação do epitélio intestinal. O crescimento excessivo de cepas de *E. coli* no intestino permite a translocação dessas bactérias através do epitélio intestinal, seguido por sua sobrevivência em linfonodos mesentéricos para entrar na corrente sanguínea e causar sepse (LJUNGDAHL et al., 2000; MACFIE et al., 1999; VAISHNAVI, 2013). A translocação bacteriana ocorre mais frequentemente em pacientes com obstrução intestinal e em pacientes imunocomprometidos (VAISHNAVI, 2013).

A meningite neonatal causada por *E. coli* é um exemplo de translocação bacteriana e uma complicação grave da bacteremia. A colonização inicial, ocorre após as bactérias terem sido adquiridas da mãe no período perinatal, é seguida por transcitose através de enterócitos para a corrente sanguínea. A progressão da doença depende de uma alta carga bacteriana no sangue, e para isso ocorrer é necessário que *E. coli* consiga sobreviver neste ambiente e cruze a barreira hematoencefálica (CROXEN; FINLAY, 2010; KIM, 2016). As taxas de casos fatais variaram de 15% a 40% e aproximadamente 50% dos sobreviventes sofrem de sequelas neurológicas (KIM, 2016; WANG; KIM, 2013).

## 1.6 ExPEC E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os antibióticos são um dos pilares da saúde pública e desempenham um papel fundamental na melhoria da saúde e bem-estar das pessoas em todo o mundo, no entanto, o uso excessivo levou à seleção da resistência aos antimicrobianos. Os BGN, incluindo *E. coli*, surgiram como uns dos principais protagonistas da resistência a múltiplos fármacos. Alguns dos mecanismos de resistência mais recentes surgiram dos chamados clones de alto risco, que facilitam a persistência e maior disseminação de traços de resistência em todo o mundo (VILA et al., 2016).

ExPEC geralmente apresenta resistência às cefalosporinas, fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos e sulfonamidas (FEGLO et al., 2013; TALAN et al., 2017). Em particular, o grupo clonal ST131 é predominante em ExPEC do grupo B2 e está frequentemente associado à resistência às fluoroquinolonas e à produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) do tipo CTX-M (BOZCAL et al., 2018; MIAJLOVIC et al., 2016).

As ESBL são enzimas capazes de hidrolisar todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção das cefamicinas e de carbapenêmicos. Sua característica fenotípica importante é que, geralmente, permanecem sensíveis à ação de inibidores de  $\beta$ -lactamases como sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam. Esses inibidores formam um complexo proteico com a  $\beta$ -lactamase, bloqueando, desta maneira, a atividade hidrolítica dessas enzimas (WILLIAMS, 1997).

A prevalência de ExPEC do grupo clonal ST131 produtor de ESBL foi de 45,8% na Alemanha, 41% no sul da Europa, 39,9% na Turquia (AKTAŞ et al., 2017; ARVAND; MOSER; PFEIFER, 2013; POMBA et al., 2014). No Brasil, segundo Rossi, (2011) a prevalência geral de *E. coli* produtora de ESBL pode variar de 10 a 18%. Recentemente, pesquisadores encontraram uma taxa de 7,1% de ESBL em UPEC (GONÇALVES et al., 2016). Seki et al. (2013), em estudo realizado em 7 hospitais brasileiros, encontraram uma prevalência de 15% de ExPEC isoladas da corrente sanguínea produtoras de ESBL, sendo que 55% foram caracterizadas como CTX-M-15.

Desde o final da década de 1990, as enzimas CTX-M, assim denominadas devido à capacidade de hidrolisar cefotaxima, se espalharam entre os continentes tornando-se as mais prevalentes no mundo. As  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M

pertencem a um grupo heterogêneo de classe molecular A com um sítio ativo de serina, que inclui pelo menos cinco grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 (CANTÓN; COQUE, 2006; D'ANDREA et al., 2013).

Nos países da América do Sul (incluindo o Brasil), as variantes CTX-M que foram descritas incluem principalmente CTX-M-2 e CTX-M-15 (variantes de CTX-M-1). No entanto, outras variantes como, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-59 (variantes de CTX-M-2), também foram identificadas (VILLEGAS et al., 2008). Uma elevada frequência de variantes CTX-M foi descrita na região sudeste do Brasil, especialmente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, onde os grupos CTX-M-2 e CTX-M-1 são predominantes (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016).

A disseminação mundial de infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL do tipo CTX-M estão associadas ao aumento da mortalidade, da morbidade, dos custos dos cuidados de saúde e do uso de antimicrobianos de amplo espectro. (PITOUT; LAUPLAND, 2008).

ExPEC é capaz de sobreviver, se multiplicar e estabelecer infecção em diferentes sítios anatômicos através da síntese de FVs e da presença de PAIs e plasmídeos. Segundo Phillips-Houlbrack et al. (2018), alguns genes de virulência são tecidos-específicos, ou seja, são determinantes para que ocorra a infecção de um sítio anatômico específico. Entre as infecções extraintestinais, a infecção da corrente sanguínea por *E. coli* é considerada uma forma grave de infecção que pode evoluir para sepse com grandes taxas de mortalidade (RUSSO et al., 2003).

Embora *E. coli* não seja um dos microrganismos mais frequentemente isolados da infecção da corrente sanguínea no Hospital Universitário de Londrina, é a principal causa de infecção do trato urinário, tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, sendo uma das principais portas de entrada para infecção da corrente sanguínea (MICENKOVÁ et al., 2017). O conhecimento de fatores determinantes, como a patogenicidade e os dados epidemiológicos do processo infeccioso, são informações importantes para o desenvolvimento de estratégias de prevenção da infecção e no manejo e tratamento de pacientes com infecção extraintestinal por *E. coli*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as características moleculares e epidemiológicas das amostras de ExPEC de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina, no período de 2015 a 2017.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Determinar as características epidemiológicas e demográficas dos pacientes com bacteremia por *E. coli*.
- 2.2.2 Determinar a sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli* de sangue.
- 2.2.3 Caracterizar por teste genotípico os isolados de *E. coli* produtores de ESBL.
- 2.2.4 Detectar por teste genotípicos os fatores de virulência e ilhas de patogenicidade dos isolados de *E. coli*.
- 2.2.5 Classificar os isolados de *E. coli* de acordo com o grupo filogenético.
- 2.2.6 Comparar o perfil de virulência de *E. coli* em diferentes materiais clínicos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS

Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo, descritivo, no qual foram incluídas 183 amostras de *E. coli*, 48 isolados da corrente sanguínea, 42 de líquidos e secreções e 44 isolados de *E. coli* produtores de ESBL, de urina de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina (2015-2017) e 49 isolados de *E. coli* sensíveis todos os antimicrobianos, de pacientes com ITU adquirida na comunidade. Apenas uma amostra por paciente foi estudada.

Hemoculturas positivas foram detectadas pelo sistema automatizado BACTEC™ FX (Becton Dickinson). As amostras foram previamente identificadas pelo sistema VITEK® 2 (bioMérieux) e armazenadas em TSB (*Tryptic Soy Broth*) com glicerina 15% (-20°C), até a realização dos testes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina CAAE 43013315.8.0000.5231

#### 3.2 COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

Foram coletados dados demográficos de todos os pacientes, incluindo idade, gênero, comorbidades e causa do óbito através dos prontuários cedidos para consulta pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital Universitário de Londrina. Através do sistema informatizado Labhos®, foi possível analisar os resultados dos exames laboratoriais. Relacionando os dados clínicos e laboratoriais, como culturas microbiológicas, leucócitos e proteína C reativa, foi possível determinar a origem da infecção e a mortalidade relacionada a infecção da corrente sanguínea por *E. coli*.

#### 3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE

Para a identificação dos isolados utilizou-se o cartão VITEK® 2 GN ID e o cartão VITEK® 2 AST 239 para avaliação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Testes de complementação com disco de fusão foram realizados. A

interpretação foi realizada de acordo com os critérios do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), 2017.

### 3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi preparado para PCR simples usando o método de fervura. De três a 5 colônias da bactéria crescidas em Mueller Hinton Agar, foram suspensas em 0,5 ml de água ultra pura e fervido durante 10 minutos (min), seguido de choque térmico por 5 min. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10min e o sobrenadante foi utilizado.

### 3.5 DETECÇÃO DE B-LACTAMASES

As amostras resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos foram caracterizadas genotipicamente por PCR. Foi realizada a técnica de PCR multiplex, através do TopTaq<sup>®</sup> Master Mix Kit (QIAGEN<sup>®</sup>), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 25 segundos a 94°C de desnaturação, 40 segundos a 52°C para hibridização e 50 segundos a 72°C de extensão e um alongamento final de 6 minutos a 72°C para os genes *bla*<sub>CTX-M1</sub>, *bla*<sub>CTX-M2</sub>, *bla*<sub>CTX-M8</sub>, *bla*<sub>CTX-M9</sub> e *bla*<sub>CTX-M25</sub> (WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006). A PCR para a pesquisa do gene *bla*<sub>CTX-M15</sub> foi realizada de acordo com Leflon-Guibout et al., (2004). A reação foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 7 minutos, 94°C por 1 minutos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 6 minutos. A PCR para a pesquisa do gene *bla*<sub>KPC</sub> foi realizada de acordo com Bradford et al. (2004). A reação foi submetida a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os iniciadores utilizados estão descritos na **Tabela 1**.

### 3.6 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA

Os isolados de *E. coli* foram classificados em 7 grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F e clado I), baseando-se na presença dos genes *chuA* e *yjaA*, *arpA*, *trpA* e um fragmento de DNA (TSPE4.C2), por meio do método da PCR. Para a

reação foram utilizados 1,25µL (2x) de tampão – 0,5mM de dNTP, 0,5µL de cada iniciador; 0,25µL de taq polimerase (5U) e 2,5 µL de DNA, completando a mistura para 12,5µL com água ultra-pura para cada amostra. Esse material foi submetido a um ciclo de 94°C por 4 min e 30 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 57°C (Grupo E) ou 59°C (quadruplex e grupo C), 25 segundos a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C (CLERMONT et al., 2013).

A primeira etapa da tipagem foi realizada por PCR quadruplex e a partir da presença ou ausência dos genes na orden *arpA/chuA/yjaA/TspE4.C2* foi determinado o grupo filogenético. Numa segunda etapa, testes adicionais são necessários para diferenciar em grupo C, E ou Clado I. Cepas de *Escherichia coli* que não foram classificadas entre esses grupos são descritas como classificação desconhecida e a técnica de sequenciamento *Multi-Locus Sequence Type* (MLST) é necessária para a elucidação. Os iniciadores utilizados estão descritos na **Tabela 2**.

### 3.7 FATORES DE VIRULÊNCIA

Para a identificação genotípica dos principais fatores de virulência em ExPEC foi utilizado também o método da PCR. Um total de 21 genes foram pesquisados, sendo estes: hemolisina (*hlyA* e *hlyF*), fator citotóxico necrotizante (*cnf1* e *cnf2*), colicina V (*cvaC*), aerobactina (*iutA*), yersiniobactina (*fyuA*), salmoquelina (*iroN*), fímbria tipo 1 (*fimH*), fímbria P (*papC* e *papG*), fímbria sfa (*sfaA* e *sfaS*), fímbria Afa (*afa*), resistência sérica (*iss* e *traT*), invasão do endotélio microvascular do cérebro (*ibeA*), cápsula polissacáridica (*kpsMT* K1, *KpsMT* K5, *KpsMT* II, *KpsMT* III) e proteína de membrana externa (*ompT*) (**Tabela 3**). Os iniciadores utilizados para a amplificação de DNA estão na Tabela 3. A PCR foi realizada num volume total de 25 uL contendo 5 uL do DNA da amostra, 20uL de solução contendo 0,2µL de cada nucleotídeo, 0,5 de cada primer e 1,0 U de Taq polimerase. O material foi submetido a 25 ciclos de 94°C por 5 minutos, 94°C por 1 minuto e hibridização e extensão de acordo com o primer utilizado (JOHNSON; STELL, 2000; KOGA et al., 2014).

### 3.8 ILHAS DE PATOGENICIDADE

O método da PCR foi utilizado para a detecção de um total de 8 ilhas de patogenicidade (**Tabela 4**) descritas em UPEC (SABATÉ et al., 2006)

Para a realização da PCR foi utilizado um volume total de 12,5 µL contendo 1,5µL do DNA da amostra, 0,5 µL (20 pmol/µL) de cada iniciador, 0,25µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 6,25 de mix (tampão 2X, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,2 mM de cada dNTP) e água ultrapura para completar o volume. O material foi submetido a um ciclo de 94°C por 5 minutos e 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C (SABATÉ et al., 2006). Foi utilizado *E. coli* J96 como controle positivo e a água ultrapura como controle negativo.

### 3.9 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da reação de PCR *single* foram analisados em gel de agarose a 1,0% em solução de Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x. Na aplicação no gel de agarose foram adicionados 4 µL de tampão de amostra. A eletroforese foi realizada a 80 volts, por 40 minutos. O marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Após a corrida o gel foi adicionado à solução de brometo de etídio (0,08 µL/100 mL) por 15min e visualizado em luz ultravioleta.

### 3.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, BASEADA EM SEQUÊNCIAS REPETITIVAS INTERGÊNICAS EM ENTEROBACTÉRIAS (ERIC –PCR)

A reação de PCR foi realizada com os primers ERIC1R (3'CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), à concentração de 50pmol, como descrito por Versalovic (1991). As reações de amplificação foram executadas para o volume final de 25 µL com tampão de PCR 1X, dNTP, Taq DNA Polimerase Recombinante Brasileira. As reações foram incubadas a 95°C por 1 minuto e em seguida 45 ciclos a 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 7 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos, usando o termociclador da Applied Biosystems. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão TBE (tris base, ácido bórico e EDTA). O aparelho foi ajustado para 100v e 400mA. A análise foi realizada pela coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e

visualização em transiluminador com lâmpada ultravioleta e posteriormente fotografado para documentação.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Dados categóricos foram demonstrados através de frequência e percentual. A análise foi realizada pelo teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fischer, quando necessário. O nível de significância alfa estipulado foi igual a 0,05. As análises dos dados foram realizadas com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20 para Windows.

**Tabela 1.** Genes codificadores de enzimas ESBL-CTXM e KPC.

Enzimas	Gene	Sequências (5'–3')	Pb	Referências
CTX-M-1	<i>bla<sub>CTX-M1</sub></i>	AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	415	Woodford et al., 2006
CTX-M-2	<i>bla<sub>CTX-M2</sub></i>	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T CCAGCGTCAGAT TTT TCA GG	552	Woodford et al., 2006
CTX-M-8	<i>bla<sub>CTX-M8</sub></i>	TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	666	Woodford et al., 2006
CTX-M-9	<i>bla<sub>CTX-M9</sub></i>	CAA AGA GAG TGC AAC GGA ATT GGA AAG CGT TCA CC	205	Woodford et al., 2006
CTX-M-25	<i>bla<sub>CTX-M25</sub></i>	GCA CGA TGA CAT TCG GG AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	327	Woodford et al., 2006
CTX-M-15	<i>bla<sub>CTX-M15</sub></i>	ATA AAA CCG GCA GCG GTG GAA TTT TGA CGA TCG GGG	483	Leflon-Guibout et al., 2004
KPC	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	850	Bradford et al., 2004

**Tabela 2.** Genes pesquisados para a classificação filogenética.

PCR	Genes	Sequências (5'–3')	Pb	Referências
<b>Multiplex</b>	<i>chuA</i>	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT	279	Clermont et al., 2013
		TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA		
	<i>yjaA</i>	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG	211	
		ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC		
<b>Grupo E</b>	TSPE4.C2	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA	152	
		CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG		
	<i>arpA</i>	GAT TCC ATC TTG TCA AAA TAT GCC	219	Clermont et al., 2013
GAA AAG AAA AAG AAT TCC CAA GAG				
<b>Grupo C</b>	<i>trpA</i>	AGT TTT ATG CCC AGT GCG AG	489	Clermont et al., 2013
		TCT GCG CCG GTC ACG CCC		

**Tabela 3.** Genes codificadores de fatores de virulência.

Genes	Sequências (5'–3')	FVs codificados	Pb	Referências
<i>kpsMT II</i>	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAC CA	Group 2 of capsular antigens	272	Johnson and Stell, 2000
<i>KpsMT III</i>	TCC TCTT GCT ACT ATT CCC CCT AGG CGT ATC CAT CCC TCC TAA C	Group 3 of capsular antigens	392	Johnson and Stell, 2000
<i>KpsMT k1</i>	TAG CAA ACG TTC TAT TGG TGC CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAC CA	K1 capsule	153	Johnson and Stell, 2000
<i>kpsMT k5</i>	CAG TAT CAG CAA TCG TTC TGT A CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAC CA	K5 capsule	159	Johnson and Stell, 2000b
<i>cvaC</i>	CAC ACA CAA ACG GGA GCT GTT CTT CCC GCA GCA TAG TTC CAT	Colicin V	680	Johnson and Stell, 2000
<i>iutA</i>	GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG	Aerobactin siderophore receptor	300	Johnson and Stell, 2000
<i>fimH</i>	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG GCA GTC ACC TGC CC TCC GGT A	Fimbriae type 1	508	Johnson and Stell, 2000
<i>fyuA</i>	TGA TTA ACC CCG CGA CGG AA CGC AGT AGG CAC GAT CTT GTA	Yersiniobactin siderophore receptor	880	Johnson and Stell, 2000
<i>papC</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G ATA TCC TTT CTG CAG GCA GGG TGT GGC	P Fimbriae	328	Johnson and Stell, 2000
<i>papG</i>	CTG TAA TTA CGG AAG TGA TTT CTG CTG TAA TTA CGG AAG TGA TTT CTG	P Fimbriae	1.070	Johnson and Stell, 2000
<i>sfaA</i>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	Sfa fimbriae	410	Johnson and Stell, 2000
<i>sfaS</i>	GTG GAT ACG ACG ATT ACT GTG CCG CCA GCA TTC CCT GTA TTC	Sfa fimbriae	240	Johnson and Stell, 2000
<i>afa</i>	GGC AGA GGG CCG GCA ACA GGC	Afa fimbriae	750	Johnson and Stell,

	CCC GTA ACG CGA CAG CAT CTC			2000
<i>ibeA</i>	AGG CAG GTG TGC GCC GCG TAC	Invasion of brain endothelium	170	Johnson and Stell, 2000
	TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC			
<i>Hly</i>	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC	Hemolysin	1.177	Johnson and Stell, 2000
	ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC			
<i>cnf1</i>	AGG AAG TTA TAT TTC CGT AGG	Cytotoxic necrotizing factor 1	498	Johnson and Stell, 2000
	GTA TTT GCC TGA ACC GTA A			
<i>cnf2</i>	AAT CTA ATT AAA GAG AAC	Cytotoxic necrotizing factor 2	543	Johnson and Stell, 2000
	CAT GCT TTG TAT ATC TA			
<i>traT</i>	GGT GTG GTG CGA TGA GCA CAG	Serum resistance	290	Johnson and Stell, 2000
	GGT GTG GTG CGA TGA GAC CAG			
<i>iroN</i>	AAT CCG GCA AAG AGA CGA ACC GCC T	Salmochelinsiderophore receptor	553	Johnson and Stell, 2000
	GTT CGG GCA ACC CCT GCT TTG ACT TT			
<i>ompT</i>	TCA TCC CGG AAG CCT CCC TCA CTA CTA T	Episomal outer membrane protease	496	Johnson and Stell, 2000
	TAG CGT TTG CTG CAC TGG CTT CTG ATA C			
<i>hlyF</i>	GGC CAC AGT CGT TTA GGG TGC TTA CC	Putative avian hemolysin	450	Johnson and Stell, 2000
	GGC GGT TTA GGC ATT CCG ATA CTC AG			
<i>Iss</i>	CAG CAA CCC GAA CCA CTT GAT G	Episomal increased serum survival	323	Johnson and Stell, 2000
	AGC ATT GCC AGA GCG GCA GAA			

**Tabela 4.** Genes codificadores de Ilhas de patogenicidade.

Ilhas de Patogenicidade	Primers	Sequências (5'-3')	Pb	Referências
PAI I <sub>536</sub>	I.9	TAA TGC CGG AGA TTC ATT GTC	1.800	Koga et al., 2014
	I.10	AGG ATT TGT CTC AGG GCT TT		
PAI II <sub>536</sub>	orf1 up	CAT GTC CAA AGC TCG AGC C	1.000	Sabaté et al., 2006
	orf1 down	CTA CGT CAG GCT GGC TTT G		
PAI III <sub>536</sub>	sfaI.1	CGG GCA TGC ATC AAT TAT CTT TG	161	Sabaté et al., 2006
	sfaI.2	TGT GTA GAT GCA GTC ACT CCG		
PAI IV <sub>536</sub>	IRP2 FP	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC	300	Sabaté et al., 2006
	IRP2 RP	TCG GGC AGC GTT TCT TCT		
PAI I <sub>CF703</sub>	RPAi	GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A	930	Sabaté et al., 2006
	RPAf	TCG CCA ATC ACA GC GAA C		
PAI II <sub>CF703</sub>	cft073.2Ent1	ATG GAT GTT GTA TCG CGC	400	Sabaté et al., 2006
	cft073.2Ent2	ACG AGC ATG TGG ATC TGC		
PAI I <sub>J96</sub>	papGlf	TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT	400	Sabaté et al., 2006
	papGlr	TGG CAT CCC ACA TTA TCG		
PAI II <sub>J96</sub>	hlyd	GGA TCC ATG AAA ACA TGG TTA ATG GG	2.300	Sabaté et al., 2006
	cnf	GAT ATT TTT GTT GCC ATT GGT TAC C		

## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram incluídos em dois artigos científicos

**Artigo I:** Presence of virulence factors and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from different clinical materials.

Submetido ao periódico *Future Microbiology* (Qualis A2).

**Artigo II:** *Escherichia coli* bloodstream infection in patients of a university hospital: virulence factors and clinical characteristics.

Submetido ao periódico *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, section *Clinical Microbiology* (Qualis A1).

## Artigo I

### Presence of virulence factors and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from different clinical materials

#### Abstract

*Escherichia coli* is an extremely common and complex human pathogen. It is both a common commensal inhabitant of the gastrointestinal tract and one of the most important pathogens in humans. Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) is descriptor for all non-commensal *E. coli* isolates capable of causing extraintestinal disease. The aim of this study was to investigate and compare the virulence determinants of ExPEC from different clinical materials. This study included 183 *E. coli* samples, 48 isolated from the bloodstream, 42 isolated from liquid and secretion, 44 isolated of inpatients with urinary tract infection (UTI), and 49 *E. coli* of outpatients with UTI. By PCR, we investigated the presence of virulence factors (VFs), pathogenicity islands (PAIs), and phylogenetic classification (A, B1, B2, C, D, E and F). The most prevalent gene in all clinical materials was *fimH* and the prevalence was statistically higher in blood and liquid/secretion (non-urinary) samples, as well as *papC* gene. *E. coli* isolated from blood and liquids/secretions showed statistically higher prevalence of genes related to serum resistance (*traT*, *iss* and *ompT*) compared to urinary samples. K5 capsule was more prevalent in urinary samples. In general, isolates of UTI of outpatients presented higher prevalence of VFs when compared to inpatients UTI isolates. In addition to the K5 capsule, *KpsMT* II (synthesis k1 and k5), adhesin FimH and salmochelin receptor (*iroN*) were also statistically more prevalent in outpatients UTI samples. The prevalence of PAIs in the different clinical materials was similar, with exception PAI IV536, that was higher prevalence in blood than inpatients UTI isolates. The phylogroup B2 was the most prevalent in isolates from all clinical materials and the second phylogroup was B1 for blood and HA-UTI, and E for liquids/secretion and outpatients UTI. There was a significant prevalence of phylogroup A in urinary that non-urinary isolates. In summary, the virulence capability is determined by a combination of distinctive accessory traits, as VFs, in conjunction with their distinctive phylogenetic background. Many different combinations of VFs occur in different ExPEC strains and can be associated with specific infectious diseases.

**Keywords:** Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*; Virulence Factors, Pathogenic Islands; Phylogenetic Classification.

#### Introduction

*Escherichia coli* is an extremely common and complex human pathogen. It is both a common commensal inhabitant of the gastrointestinal tract, and one of the

most important pathogens in humans (BOZCAL et al., 2018; VILA et al., 2016). Historically, extra-intestinal *E. coli* isolates were separated into groups determined by disease association, including uropathogenic *E. coli* (UPEC), neonatal meningitis-associated *E. coli* (NMEC), and sepsis-causing *E. coli* (SEPEC) (KÖHLER; DOBRINDT, 2011). These terms were subsequently deemed outdated following the observation that *E. coli* isolates assigned to specific groups can cause infection at multiple anatomical sites (DALE; WOODFORD, 2015). In 2000, Russo and Johnson suggested the term extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) as an alternative descriptor for all non-commensal *E. coli* isolates capable of causing extra-intestinal disease (BOZCAL et al., 2018; DALE; WOODFORD, 2015).

ExPEC have several virulence factors (VFs) that may play a role in infection by enabling the bacterial cells to move into the host and disseminate (MORA-RILLO et al., 2015). Some of these virulence genes encode virulence traits such as adhesins encoded by *fimH* (type I fimbriae), *papC* and *papG* (P-fimbriae), *sfaA* and *sfaS* (S-fimbriae), *afa* (afimbrial adhesin), toxins, damage human cells and tissues, encoded by *hlyA* ( $\alpha$ -hemolysin), *hlyF* (hemolysin F), *cnf1* and *cnf2* (cytotoxic necrotizing factor), iron acquisition factors produced by *iutA* (aerobactin), *fyuA* (yersiniabactin) and *iroN* (salmochelin), and genes that increase serum resistance, such as capsule production by *KpsMT*, protectins encoded by *traT* (outer membrane protease), *iss* (increased serum survival), *ompT* (outer membrane protease T), colicin V (*cvaC*), and the miscellaneous VF gene *ibeA* (invasion of brain endothelium) (CYOIA et al., 2015; DALE; WOODFORD, 2015; MICENKOVÁ et al., 2017; NAJAFI et al., 2018).

Virulence genes are mainly organized in large clusters called pathogenicity islands (PAI) on plasmids or integrated in the genome that, by horizontal gene transfer, explain the notable plasticity of *E. coli* genome (PHILLIPS-HOULBRACQ et al., 2018). The main virulence determinants encoded on different PAIs of ExPEC strains are included in PAI I536 ( $\alpha$ -hemolysin, CS12 fimbriae, and F17-like fimbriae adhesin) (SABATÉ et al., 2006; SAMEI; HAGHI; ZEIGHAMI, 2016), PAI II536 ( $\alpha$ -hemolysin and P-related fimbriae, hemagglutinin-like adhesion, Hek adhesion, P-fimbriae, iron-regulated proteins), PAI III536 (S-fimbriae, salmochelin, HmuR-like heme receptor, Sat toxin, Tsh-like hemoglobin protease, antigen 43) (ÖSTBLOM et al., 2011; SAMEI; HAGHI; ZEIGHAMI, 2016) PAI IV536 (yersiniabactin siderophore system) (SABATÉ et al., 2006; SAMEI; HAGHI; ZEIGHAMI, 2016), PAI ICFT073 ( $\alpha$ -

hemolysin, P-fimbriae and aerobactin), PAI IICFT073 (P-fimbriae and iron-regulated genes), PAI IJ96 ( $\alpha$ -hemolysin and P-fimbriae), and PAI IJ96 ( $\alpha$ -Hemolysin, Prs fimbriae, cytotoxic, necrotizing factor) (SABATÉ et al., 2006); SAMEI; HAGHI; ZEIGHAMI, 2016).

ExPEC has been divided into eight groups, seven (A, B1, B2, C, D, E, F) belong to *E. coli sensu stricto*, whereas the eighth is the *Escherichia* cryptic clade I according to the phylogenetic classification. Pathogenic groups of ExPEC strains generally belong to groups B2 and D (CLERMONT et al., 2013).

Extraintestinal virulence can be considered as a tissue-specific combination of numerous virulence genes that have a cumulative effect and some virulence genes seem more specific of a given organ to be infected (PHILLIPS-HOULBRACQ et al., 2018). In this context, the aim of this study was to investigate and compare the virulence determinants of ExPEC from different clinical materials.

## **Materials and Methods**

### **Bacterial Isolates**

This study included 183 *E. coli* samples, 48 isolated from the bloodstream, 42 isolated from liquid and secretion, 44 isolates from urine of inpatients, and 49 isolates from urine outpatients. Only one sample per patient was considered. Urine samples from inpatient UTI were  $\beta$ -lactam resistant and urine samples from outpatients UTI were sensitive to all antimicrobials. Positive blood cultures were detected by the automated system BACTECTM FX (Becton Dickinson). The samples were previously identified by the VITEK® 2 system (bioMérieux) and stored in TSB (Tryptic Soy Broth) with 15% glycerol (-20°C) until the tests were performed. The study was approved by the Ethics and Research Committee of the State University of Londrina CAAE 43013315.8.0000.5231.

### **Virulence Factors Genes**

The genotypic identification of the main virulence factors in ExPEC was performed using the PCR method. The genes selected were specific for hemolysins

(*hlyA* and *hlyF*), cytotoxic necrotizing factors (*cnf1* and *cnf2*), colicin V (*cvaC*), aerobactin (*iutA*), yersiniabactin (*fyuA*), salmochelin (*iroN*), type 1 fimbriae adhesin (*fimH*), P-fimbriae (*papC* and *papG*), S-fimbriae adhesin (*sfaA* and *sfaS*), afimbrial adhesin (*afa*), serum resistance (*iss* and *traT*), brain microvascular endothelium invasion (*ibeA*), capsules (*kpsMT K1*, *KpsMT K5*, *KpsMT II*, *KpsMT III*), and outer membrane protein (*ompT*) (JOHNSON; STELL, 2000; KOGA et al., 2014).

### **Detection of PAI Markers**

The presence of sequences associated with seven different PAIs, previously characterized in UPEC, was determined (PAI I536, II536, III536, IV536, ICFT073, IICFT073, IJ96 and IIJ96) (SABATÉ et al., 2006).

### **Phylogenetic Classification**

*E. coli* isolates were classified into 7 phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E, F and clade I), based on the presence of the genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA*, and a DNA fragment (TSPE4.C2) by the PCR method (CLERMONT et al., 2013).

### **Statistical analysis.**

Categorical data were shown by frequency and percentage. The analysis was performed by Chi-square test or Fischer's exact test, when necessary. The alpha significance level was 0.05. Data analysis was performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS - IBM Corp., New York, USA), version 20 for Windows.

## **Results**

### **Virulence Factors**

Adhesin FimH was the most prevalent among all isolates of different clinical materials, blood (95.8%), liquid/secretion (100.0%), urine of inpatients (77.3%), and urine of outpatients (98.0%). Blood and liquid/secretion had as second most prevalent gene *traT*, serum resistance gene, with 77.1% and 61.9%, respectively.

While the second most prevalent gene for inpatients and outpatients with UTI was *fyuA*, iron acquisition system, with 54.5% and 67.3% of prevalence. Interestingly, in the third position the prevalence of the genes is inverted among blood and liquids/secretion and urinary samples. Blood and liquid/secretion had with third most prevalent gene *fyuA* (70.8%) and *iutA* (59.5%), respectively. However, urine of inpatients was *traT* (40.9%) in the third most prevalent genes, and for urine of outpatients were *traT* (55.1%) and *KpsMT II* (55.1%) (**Table 1**).

The fourth most prevalent gene was the gene related to the acquisition of iron for all clinical materials, however, for outpatients UTI samples, the K5 capsule presented the same prevalence (**Table 1**).

Ten (20.8%) *E. coli* of blood, 7 (16.7%) *E. coli* of liquids/secretions, 3 (6.1%) *E. coli* of urine outpatients and 2 (4.5%) *E. coli* of urine inpatients showed positivity for the *cvaC*, *hlyF*, *iroN*, *iss*, and *ompT* genes. These genes have been described as the conserved virulence plasmidic (CVP) region (having 8 genes or operons: *iro*, *iuc*, *sit*, *ompTp*, *cva*, *hlyF*, *ets* and *iss*).

*E. coli* of urine of outpatients presented a significance prevalence of *KpsMTII* when compared to liquid/secretion and urine of inpatients. *KpsMT K5* was also more prevalent in isolates than others clinical materials. *fimH* and *iroN* were more prevalent in urine of outpatients than inpatients samples. In general, urine of outpatients presented a higher prevalence of VFs than inpatients (**Table 1**).

Isolates of *E. coli* from blood present higher prevalence of PapC adhesin when compared to isolates of fluid/secretion and urine of inpatients and serum resistance *traT* gene when compared to urine isolates.

When we grouped and compared samples of inpatients and outpatient's urine (Group 1), and blood + liquids and secretions (Group 2), we obtained a higher prevalence ( $p < 0.05$ ) of the *traT*, *iss*, *hlyF*, *iutA*, and *fimH* genes in Group 2. In Group 1 we obtained a higher prevalence for the k5 capsule (**Table 2**).

**Table 1.** Prevalence of virulence factors and islands of pathogenicity in different clinical materials.

Genes	Blood (n=48)	Liquid/Secretion (n=42)	Urine Inpatients (n=44)	Urine Outpatients (n=49)	Total
<b>Virulence factors, n (%)</b>					
<i>afa</i>	5 (10.4)	1 (2.4)	3 (6.8)	7 (14.3)	16 (8.7)
<i>papC</i>	17 (35.4) <sup>a,b</sup>	4 (9.5) <sup>a</sup>	6 (13.6) <sup>b</sup>	12 (24.5)	39 (21.1)
<i>papG</i>	-	-	-	-	-
<i>sfaA</i>	2 (4.2)	1 (2.4)	-	4 (8.2)	7 (3.8)
<i>sfaS</i>	3 (6.3)	1 (2.4)	-	4 (8.2)	8 (4.4)
<i>fimH</i>	46 (95.8) <sup>b</sup>	42 (100.0) <sup>d</sup>	34 (77.3) <sup>b,d,e</sup>	48 (98.0) <sup>e</sup>	170 (92.9)
<i>iutA</i>	31 (64.6)	25 (59.5)	20 (45.5)	23 (46.9)	99 (54.1)
<i>iroN</i>	18 (37.5) <sup>b</sup>	10 (23.8)	5 (11.4) <sup>b,e</sup>	15 (30.6) <sup>e</sup>	48 (26.2)
<i>fyuA</i>	34 (70.8)	24 (57.1)	24 (54.5)	33 (67.3)	115 (62.8)
<i>cvaC</i>	15 (31.1)	7 (16.7)	5 (11.4)	13 (16.7)	40 (21.9)
<i>traT</i>	37 (77.1) <sup>b,c</sup>	26 (61.9)	18 (40.9) <sup>b</sup>	27 (55.1) <sup>c</sup>	108 (59.0)
<i>iss</i>	10 (20.8)	9 (21.4)	4 (9.1)	3 (6.1)	26 (14.2)
<i>ibeA</i>	2 (4.2)	6 (14.3)	5 (11.4)	6 (12.2)	19 (10.4)
<i>kpsMT</i> k1	4 (8.3)	2 (4.8)	3 (6.8)	3 (6.1)	12 (6.6)
<i>kpsMT</i> II	22 (45.8)	12 (28.6) <sup>f</sup>	15 (34.1) <sup>e</sup>	27 (55.1) <sup>e,f</sup>	76 (41.5)
<i>KpsMT</i> III	1 (2.1)	-	2 (4.5)	1 (2.0)	4 (2.2)
<i>kpsMT</i> k5	10 (20.8) <sup>c</sup>	8 (19.0) <sup>f</sup>	9 (20.5) <sup>e</sup>	23 (46.9) <sup>c,e,f</sup>	50 (27.3)
<i>ompT</i>	10 (20.8)	11 (26.2)	6 (13.6)	3 (26.6)	30 (16.4)
<i>hlyF</i>	10 (20.8) <sup>c</sup>	13 (31.0) <sup>f</sup>	6 (13.6)	3 (6.1) <sup>c,f</sup>	32 (17.5)
<i>hlyA</i>	7 (14.6)	4 (9.5)	5 (11.4)	11 (22.4)	27 (14.8)
<i>cnf1</i>	6 (12.5)	4 (9.5)	5 (11.4)	9 (18.4)	24 (13.1)
<i>cnf2</i>	-	-	-	-	-
<b>Pathogenicity islands, n (%)</b>					
PAI I <sub>536</sub>	6 (12.5)	2 (4.8)	5 (11.4)	8 (16.3)	21 (11.5)
PAI II <sub>536</sub>	3 (6.3)	3 (7.1)	4 (9.1)	5 (10.2)	15 (8.2)
PAI III <sub>536</sub>	2 (4.2)	1 (2.4)	-	4 (8.2)	7 (3.8)
PAI IV <sub>536</sub>	37 (77.1) <sup>b</sup>	24 (57.1)	24 (54.5) <sup>b</sup>	33 (67.3)	118 (64.5)
PAI I <sub>CFT073</sub>	25 (52.1)	17 (40.5)	16 (36.4)	21 (42.9)	79 (43.2)
PAI II <sub>CFT073</sub>	13 (27.1)	15 (35.7)	12 (27.3)	18 (36.7)	58 (31.7)
PAI I <sub>J96</sub>	-	-	-	-	-
PAI II <sub>J96</sub>	5 (10.4)	3 (7.1)	5 (11.4)	8 (16.3)	21 (11.5)

Chi square test. Data expressed as absolute number (%).

<sup>a</sup>Blood vs liquids/secretions

<sup>b</sup>Blood vs urine inpatients

<sup>c</sup>Blood vs urine outpatients

<sup>d</sup>Urine inpatients vs liquids/secretion

<sup>e</sup>Urine inpatients vs urine outpatients

<sup>f</sup>Urine outpatients vs liquids/secretion

<sup>a,b,c,d,e,f</sup>p<0.05

**Table 2.** Comparison of virulence factors and phylogenetic group between urine samples and blood + liquids/secretions.

Genes	Group 1 (n=93)	Group 2 (n=90)	p value
<i>iss</i>	7 (7.5%)	19 (21.1%)	0.009
<i>traT</i>	45 (48.4%)	63 (70.0%)	0.003
<i>ompT</i>	9 (9.7%)	21 (23.3%)	0.013
<i>iutA</i>	43 (46.2%)	56 (62.2%)	0.030
<i>hlyF</i>	9 (9.7%)	23 (25.6%)	0.005
<i>fimH</i>	82 (88.2%)	87 (96.7%)	0.031
<i>KpsMT K5</i>	32 (34.4%)	18 (20.0%)	0.029
<b>Phylogenetic Groups</b>			
A	16 (17.2%)	6 (6.7%)	0.028
B1	15 (16.1%)	14 (15.6%)	-
B2	28 (30.1%)	38 (42.2%)	-
C	2 (2.2%)	1 (1.1%)	-
D	1 (1.1%)	2 (2.2%)	-
E	19 (20.4%)	16 (17.8%)	-
F	6 (6.5%)	5 (5.6%)	-
NotGrouped	6 (6.5%)	8 (8.9%)	-

Chi-square Test. Data expressed as absolute number (%).

Group 1= Urine of inpatients and outpatients.

Group 2= Blood and liquid/secretion.

### Pathogenicity Islands Distribution

PAI IV<sub>536</sub> was the most prevalent among all isolates, blood (77.1%), liquid/secretion (57.1%), urine of inpatients (54.5%), and urine of outpatients (67.3%). Just as the PAI ICFT<sub>073</sub> was the second most prevalent in all isolates of all clinical materials, blood (52.1%), liquid/secretion (40.5%), urine of inpatients (36.4%), and urine of outpatients (42.9%). In the third position, PAI IICFT<sub>073</sub> was the most prevalent isolates of all clinical subjects again, blood (27.1%), liquid/secretion (35.7%), urine of inpatients (36.4%), and urine of outpatients (42.9%). The other PAIs surveyed are distributed differently among clinical materials. There was a significant prevalence of specific PAI IV<sub>536</sub> in blood when compared with HA-UTI isolates (**Table 1**).

### Phylogenetic classification

The most prevalent group was B2 (36.1%), followed by E (19.1%), B1 (15.8%), A (12.0%), F (6.0%), and C and D with the same prevalence (1.6%) among

all the isolates. The B2 group was also the most prevalent in all clinical materials, however, the prevalence of the other phylogroups was divergent. The presence of *E. coli* isolates from blood samples showed the following distribution among the phylogenetic groups: B2 (45.8%), B1 (18.8%), E (14.6%), F (6.3%), A (4.2%), and D. *E. coli* isolated from urine of inpatients presented the following prevalence: B2 (27.3%), B1 (18.8%), A and E (15.9%), F (11.4%), and C (2.3%). *E. coli* isolated from urine of outpatients had the following prevalence: B2 (32.7%), followed by E (24.5%), A (18.4%), B1 (14.3%) and C, D, and F with prevalence (2.0%). *E. coli* isolates of fluid/secretion presented the following prevalence: B2 (38.1%), E (21.4%), B1 (11.9%), A (9.5%), F (4.8%), and C and D with the same prevalence (2.4%). Fourteen (7.7%) of the isolates were not grouped, and the Multi-Locus Sequence Type (MLST) sequencing technique is required for elucidation (**Table 3**).

There was a significant prevalence of phylogroup A in urine of outpatients when compared with blood isolates ( $p=0.046$ ), however, this difference is more evident when we grouped in urinary (Group 1) and non-urinary samples (Group 2) ( $p = 0.028$ ) (**Table 2**).

**Table 3.** Phylogenetic classification of the different clinical materials.

Clinical Materials	Groups Phylogenetic, n (%)								Total
	A	B1	B2	C	D	E	F	NG*	
<b>Blood</b>	2 (4.2)**	9 (16.6)	22 (45.8)	-	1 (2.1)	7(14.6)	3(6.3)	4 (8.3)	48
<b>Liquid/secretion</b>	4 (9.5)	5 (11.9)	16 (38.1)	1 (2.4)	1 (2.4)	9 (21.4)	2 (4.8)	4(9.5)	42
<b>Urine inpatients</b>	7 (15.9)	8 (18.2)	12 (27.3)	1 (2.3)	-	7 (15.9)	5 (11.4)	4 (9.1)	44
<b>Urine outpatients</b>	9 (18.4)**	7 (14.3)	16 (32.7)	1 (2.0)	1 (2.0)	12 (24.5)	1 (2.0)	2 (4.1)	49
<b>Total</b>	22 (12.0)	29 (15.8)	66 (36.1)	3 (1.6)	3 (1.6)	35 (19.1)	11 (6.0)	14 (7.7)	183

Chi-square Test. Data expressed as absolute number (%).

\*Not Grouped (NG).

\*\* Blood vs urine outpatients ( $p=0.046$ ).

## Discussion

In this study, we evaluated the distribution of VFs, PAIs and phylogenetic classification of *E. coli* in different clinical materials. ExPEC exhibit a broad range of extraintestinal VFs that enable the strains to colonize host mucosal surfaces, avoid or subvert local and systemic host defense mechanisms, scavenge essential nutrients such as iron, injure or invade the host, and stimulate a noxious inflammatory response (JOHNSON; RUSSO, 2002). Many different combinations of virulence factors occur in different ExPEC strains, evidence that there are many pathways to extraintestinal virulence in *E. coli* (PHILLIPS-HOULBRACQ et al., 2018; VILA et al., 2016).

The most prevalent gene in all clinical materials was *fimH*. According to Russo et al. (2002), the *fim* operon occurs in almost all *E. coli*. The *fim* operon encodes type 1 fimbriae, or “common pili”, which mediate mannose-specific binding to receptors on host cells (KOREA; GHIGO; BELOIN, 2011). This adhesin mainly associated with UPEC by binding to a high-mannose glycoprotein, uroplakin (BOUCKAERT et al., 2005). However, in this study, the prevalence of *fimH* was statistically higher in non-urinary samples (Group 2). According to Johnson et al. (2002), there is more to VFs than just the presence or absence of the corresponding gene: Variable expression and qualitative functional diversity are also important. Significant differences exist between clinical isolates from different syndromes and between pathogen and commensal strains, with respect to the regulation of this (phase-variable) operon and the precise receptor specificity of the FimH adhesin molecule, or both (JOHNSON et al., 2002).

*E. coli* isolated from blood and liquids/secretions showed statistically higher prevalence of genes related to serum resistance (*traT*, *iss* and *ompT*) compared to urinary samples. In general, *E. coli* isolated from blood are more serum-resistant than strains that cause UTI. VFs associated with serum resistance are required to survive in the blood and overcome the defenses mechanisms of the host (MIAJLOVIC; SMITH, 2014). Serum resistance mechanisms utilized by *E. coli* include the production of protective extracellular polysaccharide capsules and expression of factors that inhibit or interfere with the complement cascade (MIAJLOVIC; SMITH, 2014). However, K5 capsule was more prevalent in urinary samples ( $p=0.029$ ).

K5 capsule act confers resistance to both the human innate and adaptive immune systems. The host immune system struggles to detect *E. coli* strains containing this capsule because the polysaccharide coat has features that are very similar to heparan sulphate, resulting in a significant increase in virulence of these strains (BLUNDELL et al., 2009). There are few studies reporting the prevalence of this capsule, and those that exist are related to *E. coli* bacteremia (ANANIAS; YANO, 2008).

The interesting data is that among the urinary samples the highest prevalence of the K5 capsule was in the *E. coli* from urine of outpatients, that is, in theoretically healthier and immunocompetent patients. In immunocompromised patients, it has been reported that *E. coli* strains causing extraintestinal infections carry no, or very few, VFs (OWRANGI et al., 2018). Another factor to be considered is that *E. coli* from urine of inpatients were producers of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and the isolates from urine of outpatients were sensitive to antimicrobials, suggesting a trade-off between resistance and virulence (CLERMONT et al., 2008).

In general, urine outpatients' isolates presented higher prevalence of VFs when compared to urine of inpatients isolates. In addition to the K5 capsule, *KpsMT II* (synthesis K1 and K5), adhesin FimH, and salmochelin receptor (*iroN*) were also statistically more prevalent in urine of outpatients.

Siderophore production is important for bacterial survival in the bloodstream. Aerobactin siderophore receptor (*iutA*) is commonly associated with ExPEC and those isolated from bacteremia (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011; KOGA et al., 2014; MICENKOVÁ et al., 2017). *iutA* gene was more prevalent in *E. coli* from blood and liquids/secretions than in urinary isolates ( $p=0.030$ ), it is consistent with the data in the literature. The hemolysin HlyF was also more prevalent in non-urinary isolates. *hlyF* is one of the ColV plasmid-encoded genes and was shown to be an epidemiological marker of avian pathogenic *E. coli* (APEC) and NMEC (MURASE et al., 2016). Although a potential hemolysin-associated function was initially attributed to HlyF (KACZMAREK; BUDZYŃSKA; GOSPODAREK, 2014; MORALES et al., 2004), little is known about the exact contribution of HlyF to virulence (MURASE et al., 2016). There are few studies reporting the frequency of occurrence of *hlyF* in ExPEC causing disease in humans.

Our results showed that *papC* gene was more prevalent in *E. coli* bacteremia when compared to liquids/secretion ( $p=0.006$ ) and urine of inpatients ( $p=0.019$ ). This

gene is part of the mannose-resistant P-fimbriae operon and is often associated with UPEC (NAJAFI et al., 2018; ZAMANI; SALEHZADEH, 2018), however, this adhesin have been associated with *E. coli* isolated from bacteremia (KOGA et al., 2014). One possible explanation for this result is that *E. coli* from urine of inpatients are all ESBL producer, and in the literature, it has been reported that there is a trade-off between resistance and virulence (CLERMONT et al., 2008). Another explanation is that the PapC adhesin is involved in urinary tract infection and subsequent bacteremia (LEFORT et al., 2011).

The comparison of PAIs in different *E. coli* strains indicated that identical or almost identical PAIs can exist in different *E. coli* pathotypes or strains (HOCHHUT; DOBRINDT; HACKER, 2004; VILA et al., 2016). The prevalence of PAIs in the different clinical materials was similar, with exception PAI IV<sub>536</sub>, that was higher prevalence in blood than urine of inpatient's isolates. PAI IV<sub>536</sub> is considered an island of high pathogenicity and is associated with the synthesis and transport of yersiniabactina siderophore, one of the main bacterial iron uptake systems (DOBRINDT et al., 2002), and it is more common in strains responsible for septicemia (83%) and UTI (70%) (SMATI et al., 2017). *cnf1* is known to be associated with *hlyA* in PAI IJ<sub>96</sub> (HOCHHUT; DOBRINDT; HACKER, 2004); therefore, the prevalence of *hlyA* (11.4%) and *cnf1* (11.4%) probably is due to the presence of PAI IJ<sub>96</sub> in 11.4% in the same urine of inpatients isolates.

The *E. coli* species is mainly clonal with 7 main phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E, and F) composed of numerous clones grouped in subgroups (CLERMONT et al., 2013). The B2 group is the most frequently recovered group among the ExPEC strains responsible of human infections (RUSSO; JOHNSON, 2000). The phylogroup B2 was the most prevalent in isolates from all clinical materials and the second phylogroup more prevalent was B1 for blood and urine of inpatients and E for liquids/secretion and urine of outpatients. In the old classification of Clermont et al. (2000), there was no distinction between groups D and E, all strains were classified as group D and this could explain the high prevalence of E phylogroup in isolates.

There was a significant prevalence of phylogroup A in urine of outpatients than blood isolates ( $p=0.046$ ), and this difference is more evident when we grouped in urinary and non-urinary samples ( $p=0.028$ ). According to reports in the literature, isolates belonging to groups A and B1 are more often strictly commensal strains from

the intestinal microbiota (SKJØT-RASMUSSEN et al., 2012; USEIN et al., 2016), and it is generally believed that UPEC strains originate from intestinal microbiota (BAHADORI; MOTAMEDIFAR; DERAKHSHANDEH, 2018; SINGER, 2015).

Non-group B2/D strains and clonal groups have acquired sufficient relevant accessory traits (probably via horizontal gene transfer) to become pathogenic (VILA et al., 2016). The presence of B1 and A isolates of different clinical materials shows that these strains are also capable of causing extraintestinal infection.

## Conclusion

In summary, *E. coli* from blood and liquids/secretion had a higher prevalence of genes involved in serum resistance than urinary *E. coli*. Serum resistance genes are essential for blood survival. *E. coli* from urine of outpatients carried significantly higher numbers of virulence genes than *E. coli* strains isolated from urine of inpatients. Outpatients are healthier than inpatients, so the ability to colonize and maintain infection in outpatients should be higher than inpatients. B2 was the most prevalent ExPEC phylogroup, what was expected. However, we found high prevalence of A and B1 phylogroups. In addition, the A phylogroup was higher prevalent in *E. coli* urinary than non-urinary.

## References

- ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of Escherichia coli isolated from patients with sepsis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 10, p. 877–883, 2008.
- BAHADORI, M.; MOTAMEDIFAR, M.; DERAKHSHANDEH, A. Genetic relatedness of the Escherichia coli fecal population and strains causing urinary tract infection in the same host. **Microbiology Open**, v. e759, p. 1–8, 2018.
- BLUNDELL, C. D. et al. Investigating the molecular basis for the virulence of Escherichia coli K5 by nuclear magnetic resonance analysis of the capsule polysaccharide. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 71–82, 2009.
- BOUCKAERT, J. et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli FimH adhesin. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 441–455, 2005.
- BOZCAL, E. et al. The relationship between phylogenetic classification, virulence and antibiotic resistance of extraintestinal pathogenic Escherichia coli in İzmir province, Turkey. **Journal of Life and Environmental Sciences**, v. 6, p. e5470, 2018.

CLERMONT, O. et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1024–1028, 2008.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

CYOIA, P. S. et al. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries** **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 10, p. 1068–1075, 2015.

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 615–626, 2015.

DOBRINDT, U. et al. Genetic Structure and Distribution of Four Pathogenicity Islands (PAI I536 to PAI IV536) of Uropathogenic *Escherichia coli* Strain 536. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6365–6372, 2002.

GARÉNAUX, A.; CAZA, M.; DOZOIS, C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 89–98, 2011.

GAZAL, L. E. S. et al. Presence of pathogenicity islands and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in isolates from avian organic fertilizer. **Poultry Science**, v. 94, n. 12, p. 3025–3033, 2015.

HOCHHUT, B.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Pathogenicity Islands and Their Role in Bacterial Virulence and Survival. **Concepts in Bacterial Virulence**, v. 12, p. 234–254, 2004.

JOHNSON, J. R. et al. Phylogenetic Distribution of Virulence-Associated Genes among *Escherichia coli* Isolates Associated with Neonatal Bacterial Meningitis in The Netherlands. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 6, p. 774–784, 2002.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E coli*”. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, n. 3, p. 155–162, 2002.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000.

KACZMAREK, A.; BUDZYŃSKA, A.; GOSPODAREK, E. Detection of K1 antigen of *Escherichia coli* rods isolated from pregnant women and neonates. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 5, p. 419–422, 2014.

KOGA, V. L. et al. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, 2011.

- KOREA, C. G.; GHIGO, J. M.; BELOIN, C. The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. **BioEssays**, v. 33, n. 4, p. 300–311, 2011.
- LEFORT, A. et al. Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 777–783, 2011.
- MIAJLOVIC, H.; SMITH, S. G. Bacterial self-defence: How *Escherichia coli* evades serum killing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, n. 1, p. 1–9, 2014.
- MICENKOVÁ, L. et al. Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 3, p. 182–189, 2017.
- MORA-RILLO, M. et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 93–100, 2015.
- MORALES, C. et al. Detection of a Novel Virulence Gene and a *Salmonella* Virulence Homologue Among *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 1, n. 3, p. 160–165, 2004.
- MURASE, K. et al. HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 11, p. 856–865, 2016.
- NAJAFI, A. et al. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 3, p. 335–343, 2018.
- ÖSTBLOM, A. et al. Pathogenicity island markers, virulence determinants *malX* and *usp*, and the capacity of *Escherichia coli* to persist in infants' commensal microbiotas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2303–2308, 2011.
- OWRANGI, B. et al. Invasion and translocation of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urosepsis and patients with community-acquired urinary tract infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p. 833–839, 2018.
- PHILLIPS-HOULBRACQ, M. et al. Pathophysiology of *Escherichia coli* pneumonia: Respective contribution of pathogenicity islands to virulence. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 2, p. 290–296, 2018.
- RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753–1754, 2000.
- SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical microbiology and infection**, v. 12, n. 9, p. 880–6, 2006.
- SAMEI, A.; HAGHI, F.; ZEIGHAMI, H. Distribution of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 3, p. 261–268, 2016.

SINGER, R. S. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals : evidence and data gaps. **Frontier in Microbiology**, v. 6, n. 28, p. 1–9, 2015.

SKJØT-RASMUSSEN, L. et al. Virulence factors and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from patients with bacteraemia of urinary tract origin relate to sex and hospital- vs. community-acquired origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 3, p. 129–134, 2012.

SMATI, M. et al. Strain-specific impact of the high-pathogenicity island on virulence in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 1, p. 44–56, 2017.

USEIN, C. R. et al. Molecular characterization of bacteremic *Escherichia coli* isolates in Romania. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 3, p. 221–226, 2016.

VILA, J. et al. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 4, p. 437–463, 2016.

ZAMANI, H.; SALEHZADEH, A. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: Association with adhesion factor genes. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 48, n. 1, p. 162–167, 2018.

## Artigo II

### ***Escherichia coli* bloodstream infection in patients of a university hospital: virulence factors and clinical characteristics.**

#### **Abstract**

Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) is responsible for many bloodstream infections. The aim of this study was to characterize *E. coli* isolated from the bloodstream from patients (n= 48) of University Hospital in Brazil. Epidemiological data were obtained through the analysis of medical records and laboratory tests. By PCR we investigated the presence of virulence factors (VFs), pathogenicity islands (PAIs), Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL), phylogenetic classification (A, B1, B2, C, D, E, F) and genetic variability analysis by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR). The median age of the patients was 63 years (0 - 90). The presence of immunosuppression was prevalent among patients (27.1%), as well as intestinal diseases (25.0%) and diabetes (18.8%). Half of the bloodstream infections were after urinary tract infection, 12.5% secondary to abdominal diseases. The mortality associated with *E. coli* bacteremia was 16.6%. Forty-one (85.4%) of *E. coli* had one or more genes related to serum resistance and *traT* presented a high prevalence among isolates (77.1%). In addition, 47.9% showed at least one capsule, group 2 (KpsMT II) with 45.8% and K5 specific capsule with 20.8% of prevalence. The siderophores systems were common among isolates, yersiniabactina (*fyuA*) was present in 70.8% of the isolates. The presence of PAIs was also significant, with 81.3% of the isolates being positive for one or more PAI. PAI IV536 was present in 77.1% of isolates. Phylogenetic analysis showed the group B2 (45.8%) was the most prevalent. However, in this study was found a considerable prevalence isolated from group B1 (18.8%) and E (14.6%). The B2 isolates presented the highest prevalence of VFs and PAIs. Eight (16.7%) isolates were resistant to third and fourth generation cephalosporin. Group CTX-M-1 (CTX-M-15) was the most prevalent ESBL type. The analysis of genetic variability showed two clonal lineages and several isolates not related to each other. This study provides additional information of the epidemiological and molecular characteristics of *E. coli* bloodstream infection in Brazil.

**Keywords:** ExPEC; bloodstream infection; phylogenetic group; virulence factors; ESBL; CTXM-15.

## Introduction

*Escherichia coli* is the gram-negative organism most frequently isolated in adult patients with bacteremia (MORA-RILLO et al., 2015) and in severe cases it may lead to death (OWRANGI et al., 2018). The rates of bacteremia have increased steadily in recent years (DE KRAKER et al., 2013; MIAJLOVIC et al., 2016). In general, *E. coli* constitute the normal commensal gut microbiota of healthy human populations (KÖHLER; DOBRINDT, 2011; MICENKOVÁ et al., 2017). Moreover, some strains can cause intestinal or extraintestinal infections due to the specific virulence factors (VFs) (BURDET et al., 2014; USEIN et al., 2016).

Isolates capable of gaining access to and surviving in the bloodstream are known as extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2003) and cause a variety of infections, including urinary tract infections (UTI), sepsis, and neonatal meningitis (MORA-RILLO et al., 2015; RON, 2010). The most common extra-intestinal site colonized by these bacteria is the urinary tract, which in turn is a common source of origin for bloodstream infections (MICENKOVÁ et al., 2017).

Furthermore, *E. coli* has been divided into 7 groups (A, B1, B2, C, D, E, F), according to the phylogenetic classification. Pathogenic groups of ExPEC strains generally belong to groups B2 and D. However, commensal strains that survive in the intestinal system, i.e., non-pathogenic strains, are generally included in groups A or B1 (CLERMONT et al., 2013).

ExPEC have several VFs that may play a role in infection by enabling the bacterial cells to colonize the host and disseminate. VFs are encoded on the bacterial chromosome, where they are usually located within pathogenicity islands (PAIs), or on plasmids (DALE; WOODFORD, 2015) and include adhesion molecules, iron acquisition systems, host defense-subverting mechanisms, and toxins. Several VFs have been associated with the infections of bloodstream (LEFORT et al., 2011; MORA-RILLO et al., 2015). However, predictions of initial severity and outcome based on bacterial VFs alone are not entirely accurate, and the consideration of host determinants, including underlying diseases, facilitates such predictions (JAURÉGUY et al., 2007).

When infection occurs, the host immune defense responds to eliminate the infectious agents (DIACOVICH; GORVEL, 2010). Progression of infection is mainly associated with the bacterial capability to survive such defenses. In addition, bacterial virulence properties influence the severity and extent of the infection (LEFORT et al.,

2011; OWRANGI et al., 2018). The presence of *E. coli* in the bloodstream can result in the induction of a vigorous host inflammatory response leading to sepsis which is associated with high morbidity and mortality (MIAJLOVIC; SMITH, 2014; RUSSO; JOHNSON, 2003).

In addition, the rates of multidrug resistant (MDR) *E. coli* infections are on the rise. In particular, the predominant ExPEC global lineage sequence type (ST) 131 is frequently associated with fluoroquinolone resistance and production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) (SHAIK et al., 2017), and the treatment of infections caused by ExPEC has become very challenging due to the emergence of resistance to the first-line as well as the last-resort antibiotics (SHAIK et al., 2017; USEIN et al., 2016).

In developed countries *E. coli* is a very important pathogen in infections of the bloodstream. According to Laupland (2013), *E. coli* was ranked first or second in the incidence of bloodstream infection in countries such as Australia, Canada, Denmark, Finland, Iceland, New Zealand, Sweden, and the USA. However, analyzing the frequency of *E. coli* bloodstream infection at the University Hospital in Brazil, showed that in the last years *E. coli* was responsible for 4.7%. Others studies also showed low prevalence of *E. coli* bloodstream infection in Brazilian hospitals (MARRA et al., 2011; TAVEIRA et al., 2017; YOKOTA et al., 2016). For this reason, there has been little research regarding *E. coli* bloodstream infection. However, knowledge of the impact of VFs, antimicrobial resistance, and host determinants on the severity of *E. coli* bloodstream infection is important for the determination of the epidemiological profile of bloodstream infection and could provide targets for specific intervention in the future. The aim of this study was characterized the FVs, antimicrobial sensitivity profile, and epidemiological data of *E. coli* isolates from the blood of patients at the University Hospital of Londrina.

## **Material and Methods**

### **Bacterial Isolates**

This study included 48 *E. coli* samples isolated from the bloodstream of patients admitted to the University Hospital of Londrina from 2015 to 2017. Hemoculture positive samples were detected by BACTEC™ FX (Becton Dickinson) and etiological agents were previously identified by the VITEK® 2 system (bioMérieux). The samples were

stored in nutrient agar (room temperature) and TSB (Tryptic Soy Broth) with 15% glycerol (-20°C) until the tests were carried out.

### **Collected Data**

Demographic data was collected from all patients, including age, gender, and comorbidities of medical records provided for consultation by the Medical Archive and Statistics Service (SAME) of the University Hospital of Londrina. The study was approved by the Ethics and Research Committee of the State University of Londrina CAAE 43013315.8.0000.5231.

### **Antimicrobial Susceptibility**

For the identification of the isolates, the VITEK® 2 GN ID card and the VITEK® 2 AST 239 card were used for antibiogram complemented with diffusion disk method. All cards are from bioMérieux, USA. Interpretation was performed according to the CLSI 2017 (Clinical and Laboratory Standards Institute) criteria.

### **β-lactamase Characterization**

Detection of the *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-25</sub> genes were performed by multiplex PCR, as described by Woodford et al. (2006) and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> according to Leflon-Guibout et al. (2004). The PCR reaction was enhanced using the TopTaq® Master Mix Kit (QIAGEN). PCR for the screening of the *bla*<sub>KPC</sub> gene was performed according to Bradford et al. (2004).

### **Phylogenetic Classification**

*E. coli* isolates were classified in 7 phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E, F), based on the presence of the genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA*, and a DNA fragment (TSPE4.C2) by the PCR method (CLERMONT et al., 2013).

### **Detection of Virulence Factors Genes**

The genotypic identification of the main virulence factors in ExPEC was performed using the PCR method. The genes selected were specific for hemolysins (*hlyA* and *hlyF*), cytotoxic necrotizing factors (*cnf1* and *cnf2*), colicin V (*cvaC*), aerobactin (*iutA*), yersiniabactin (*fyuA*), salmochelin (*iroN*), type 1 fimbrial adhesin (*fimH*), P-fimbriae

(*papC* and *papG*), S-fimbrial adhesin (*sfaA* and *sfaS*), afimbrial adhesin (*afa*), serum resistance (*iss* and *traT*), brain microvascular endothelium invasion (*ibeA*), capsules (*kpsMT K1*, *KpsMT K5*, *KpsMT II*, *KpsMT III*), and outer membrane protein (*ompT*) (JOHNSON; STELL, 2000).

### **Detection of Pathogenicity Islands**

The presence of sequences associated with seven different PAIs, previously characterized in uropathogenic *E. coli*, was determined (PAI I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub>, III<sub>536</sub>, IV<sub>536</sub>, PAI ICFT073, II<sub>CFT073</sub>, PAI I<sub>J96</sub> and II<sub>J96</sub>) (SABATÉ et al., 2006).

### **Analysis of Genetic Variability**

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) was performed as previously described by Versalovic et al. (1994). Analysis of genomic fingerprinting were performed using GelJ v.2.0 software by Dice similarity method. Strains were considered genetically related if the similarity index was  $\geq 85\%$ .

### **Statistical Analysis**

Categorical data were shown by frequency and percentage. The analysis was performed by Chi-square test or Fischer's exact test when necessary. The alpha significance level was 0.05. Data analysis was performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS - IBM Corp., New York, USA), version 20 for Windows.

## **Results**

### **Demographic and Clinical Characteristics**

The median age of the 48 patients was 63 years (range 0 - 90 years) and 56.2% were male. Twenty-three (47.9%) were aged over 65 years and 4 (8.3%) of patients were aged under one year. In this study, the most prevalent comorbidity was systemic arterial hypertension (43.8%), followed by intestinal disease (25.0%), diabetes (18.8%), coronary disease, solid tumor, and renal failure with (12.5%) each, hematological malignancy and cirrhosis with 10.4% each, immunologic disease and viral hepatitis with 8.3% each, and HIV with 6.3% (**Table 1**).

According to data from medical records and laboratory data, 24 (50.0%) patients had bacteremia from urinary origin, 6 (12.5%) abdominal, 4 (8.3%) pulmonary, 3 (6.3%)

early-onset neonatal sepsis, 2 (4.2%) medical procedure, one patient had bacteremia after amputation of the lower limb and another patient after biopsy of the prostate, and 9 (18.7%) cases of bacteremia did not have the origin defined. Of the 48 patients studied, half (50.0%) died, and in 8 (33.3%) of these patients the death was related by *E. coli* bloodstream infections (**Table 1**).

When comparing patients who died due to *E. coli* sepsis, those who died from other causes, and those who survived, it was observed that there was a significant difference in HIV among the groups. The 3 patients HIV positive were classified in the group of patients who died from other causes ( $p=0.041$ ). The *iroN* and *cvaC* genes were less prevalent in *E. coli* strains related to patient death ( $p= 0.027$  and  $p= 0.043$ ), unlike, the *afa* gene that was most prevalent in the same strains ( $p= 0.016$ ). Another variable that produced differing results among the groups was antibiotic therapy. The use of third generation cephalosporins was more prevalent in patients who died due to *E. coli* bacteremia ( $p=0.040$ ), and the use of polymyxin was higher in the group of patients who died due to other causes ( $p= 0.041$ ) (data not shown).

<b>Table 1.</b> Characteristics of patients with <i>Escherichia coli</i> bacteremia.		
<b>Characteristics</b>		<b>(n=48)</b>
	Age (years), median (range)	63 (0-90)
	Male gender, n (%)	27 (56.2)
<b>Comorbidities, n (%)</b>		
	Systemic Arterial Hypertension	21 (43.8)
	Intestinal disease	12 (25.0)
	Diabetes	9 (18.8)
	Coronary disease	6 (12.5)
	Solid Tumor	6 (12.5)
	Renal failure	6 (12.5)
	Hematological malignancy	5 (10.4)
	Cirrhosis	5 (10.4)
	Immunologic disease	4 (8.3)
	Viral hepatitis	4 (8.3)
	HIV	3 (6.3)
<b>Origin of bacteremia, n (%)</b>		
	Urinary	24 (50.0)
	Abdominal	6 (12.5)
	Pulmonary	4 (8.3)
	Early neonatal sepsis	3 (6.3)
	Medical procedure	2 (4.2)
	Not defined	9 (18.7)
<b>Deaths, n (%)</b>		
	Total	24 (50.0)
	<i>E. coli</i>	8 (33.3)

## Antibiotic Resistance

The *E. coli* isolates exhibited a high rate of resistance to ampicillin (64.6%), ampicillin-sulbactam (56.3%), followed of sulfamethoxazole-trimethoprim (45.8%), and ciprofloxacin (35.4%). Nine (18.8%) isolates were resistant to gentamicin and 1 (2.1%) to amikacin, 7(14.6%) to piperacillin-tazobactam and only 1 (2.1%) isolate was resistant to carbapenems and positive for the *bla*<sub>KPC</sub> (**Figure 1**).

Of the 48 isolates, 8 (16.7%) were resistant to third and fourth generation cephalosporin and were producing ESBL type CTX-M. Seven (14.6%) isolates were positives to group CTX-M-1 and of those, five isolates were positives to CTX-M-15. Other variants were also found, CTX-M-9, CTX-M-2 and CTX-M-25. All ExPEC-producing CTX-M showed a combination of more than one enzyme except for 1 isolate (**Figure 1**).

## Phylogenetic Analysis

The phylogenetic group B2 (45.8%) was predominant among ExPEC strains. Whereas groups B1 (18.8%), E (14.6%), F (6.3%), A (4.2%), and D (2.1%) exhibited the lowest frequency and 4 (8.2%) isolates were not grouped.

## Distribution of Virulence Factors and Pathogenicity Islands

In the present study, the most predominant virulence genes are *fimH* (95.8%), followed by *traT* (77.1%), *fyuA* (70.8%), *iutA* (64.3%), *KpsMT* II (45.8%), *iroN* (37.5%), *papC* (35.4%), *cvaC* (31.3%), *iss* (20.8%), *KpsMT* K5 (20.8%), *ompT* (20.8%), *hlyF* (20.8%), *hlyA* (14.6%), *cnf1* (12.5%), *afa* (10.4%), *KpsMT* K1 (8.3%), *sfaS* (6.3%), *sfaA* (4.2%), *ibeA* (4.2%), *KpsMT* III (2.1%). No isolates were positive for the genes *papG* and *cnf2* (**Table 2**).

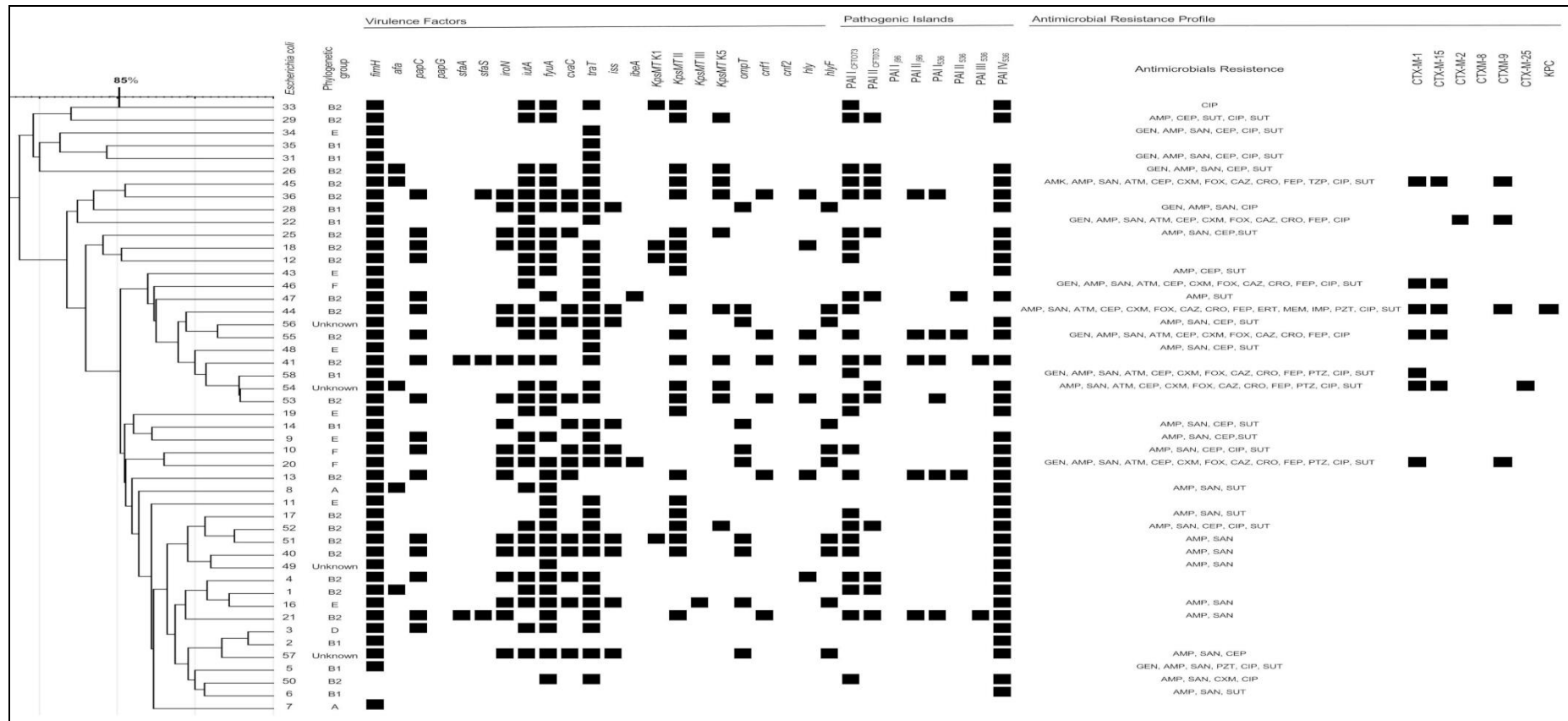
Ten (20.8%) isolates were positive for the *cvaC*, *hlyF*, *iroN*, *iss*, and *ompT* genes. These genes have been described as the conserved virulence plasmidic (CVP) region (having 8 genes or operons: *iro*, *iuc*, *sit*, *ompT*<sub>p</sub>, *cva*, *hlyF*, *ets* and *iss*). Six of these isolates were classified in 4 different phylogenetic groups (B2, B1, F, E), and two isolates were not grouped.

The most prevalent PAI was PAI IV<sub>536</sub> (77.1%), followed by PAI Ic<sub>FT073</sub> (52.1%), PAI II<sub>cFT073</sub> (27.1%), PAI I<sub>536</sub> (12.5%), PAI II<sub>J96</sub> (10.4%), PAI II<sub>536</sub> (6.3%), and PAI III<sub>536</sub> (4.2%). PAI I<sub>J96</sub> was not detected in this study (**Table 2**). The bloodstream

isolates contained at least one of the investigated PAI, and the most frequent combination pattern was related to those strains with PAI IV<sub>536</sub> and PAI I<sub>CFT073</sub> (47.9%). No strain presented all the PAIs.

**Table 2.** Prevalence of virulence factors, islands of pathogenicity of 48 blood *Escherichia coli* isolates, 2015-2018.

Genes	ExPEC (n=48)	Genes	ExPEC (n=48)
<b>Virulence Factors</b>	<b>n (%)</b>		
<i>fimH</i>	46 (95.8)	<i>KpsMT III</i>	1 (2.1)
<i>afa</i>	5 (10.4)	<i>ompT</i>	10 (20.8)
<i>papC</i>	17 (35.4)	<i>hlyF</i>	10 (20.8)
<i>papG</i>	-	<i>hlyA</i>	7 (14.6)
<i>sfaA</i>	2 (4.2)	<i>cnf1</i>	6 (12.5)
<i>sfaS</i>	3 (6.3)	<i>cnf2</i>	-
<i>iutA</i>	31 (64.3)		
<i>iroN</i>	18 (37.5)	<b>Pathogenicity islands</b>	<b>n (%)</b>
<i>fyuA</i>	34 (70.8)	PAI I <sub>536</sub>	6 (12.5)
<i>cvaC</i>	15 (31.3)	PAI II <sub>536</sub>	3 (6.3)
<i>traT</i>	37 (77.1)	PAI III <sub>536</sub>	2 (4.2)
<i>iss</i>	10 (20.8)	PAI IV <sub>536</sub>	37 (77.1)
<i>ibeA</i>	2 (4.2)	PAI I <sub>CFT073</sub>	25 (52.1)
<i>KpsMT K1</i>	4 (8.3)	PAI II <sub>CFT073</sub>	13 (27.1)
<i>KpsMT K5</i>	10 (20.8)	PAI I <sub>J96</sub>	-
<i>KpsMT II</i>	22 (45.8)	PAI II <sub>J96</sub>	5 (10.4)



**Figure 1.** ERIC-PCR molecular fingerprint profiles of 48 *Escherichia coli* bloodstream infection, virulence determinants and antimicrobial resistance profile. Amikacin (AMK), gentamicin (GEN), ampicillin (AMP), ampicillin-sulbactam (SAN), aztreonam (ATM), cephalothin (CEP), cefuroxime (CXM), cefoxitin (FOX), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO), cefepime (FEP), imipenem (IMP), meropenem (MEM), ertapenem (ERT), piperacillin-tazobactam (PTZ), ciprofloxacin (CIP), sulfamethoxazole-trimethoprim (SUT).

### Comparison of Virulence Factors and Pathogenicity Islands with Phylogroups

The phylogenetic group B2 had the highest frequency regarding both virulence genes and PAIs markers compared to other phylogenetic groups. In this investigation, there was a significant association between phylogenetic group B2 and the presence of virulence genes such as *papC*, *fyuA*, *KpsMT K1*, *KpsMT K5*, *KpsMT II*, *hlyA*, and *cnf1* (Table 3).

An increased presence of PAI markers was observed in the phylogenetic group B2, while the lowest was related to the other phylogroups. The high frequency of the B2 group was statistically significant in PAI I<sub>536</sub>, PAI IV<sub>536</sub>, PAI ICFT073, PAI IICFT073, and PAI II<sub>J96</sub> (Table 3).

**Table 3.** Phylogenetic group relation with virulence factors and islands of pathogenicity of 48 blood *Escherichia coli* isolates, 2015-2018.

Genes	Phylogenetic groups		Total (n=48)	p value
	B2 (n=22)	Non-B2 (n=26)		
<b>Virulence factor, n (%)</b>				
<i>fimH</i>	21 (45.7)	25 (54.3)	46 (95.8)	-
<i>afa</i>	3 (60)	2 (40.0)	5 (10.4)	-
<i>papC</i>	14 (82.4)	3(17.6)	17 (35.4)	<0.001
<i>papG</i>	-	-	-	-
<i>sfaA</i>	2 (100.0)	-	2 (4.2)	-
<i>sfaS</i>	3 (100.0)	-	3 (6.3)	-
<i>iutA</i>	17 (54.8)	14 (45.2)	31 (64.3)	-
<i>iroN</i>	11 (61.1)	7 (38.9)	18 (37.5)	-
<i>fyuA</i>	21 (61.8)	13 (38.2)	34 (70.8)	0.001
<i>cvaC</i>	8 (53.3)	7 (46.7)	15 (31.3)	-
<i>traT</i>	19 (51.4)	18 (48.6)	37 (77.1)	-
<i>iss</i>	3 (30.0)	7 (70.0)	10 (20.8)	-
<i>ibeA</i>	1 (50.0)	1 (50.0)	2 (4.2)	-
<i>kpsMT k1</i>	4 (100.0)	-	4 (8.3)	0.023
<i>KpsMT k5</i>	9 (90.0)	1 (10.0)	10 (20.8)	0.002
<i>kpsMT II</i>	18 (81.8)	4 (18.2)	22 (45.8)	0.001
<i>kpsMT III</i>	-	1 (100.0)	1 (2.1)	-
<i>ompT</i>	3 (30.0)	7 (70.0)	10 (20.8)	-
<i>hlyF</i>	3 (30.0)	7 (70.0)	10 (20.8)	-
<i>hlyA</i>	7 (100.0)	-	7 (14.6)	0.002
<i>cnf1</i>	6 (100.0)	-	6 (12.5)	0.004
<i>cnf2</i>	-	-	-	-
<b>Pathogenicity islands, n (%)</b>				
PAI I <sub>536</sub>	6 (100.0)	-	6 (12.5)	0.010
PAI II <sub>536</sub>	3 (100.0)	-	3 (6.3)	-

PAI III <sub>536</sub>	2 (100.0)	-	-	-
PAI IV <sub>536</sub>	21 (56.8)	16 (43.2)	37 (77.1)	0.005
PAI I <sub>CFT073</sub>	22 (88.0)	3 (12.0)	25 (52.1)	<0.001
PAI II <sub>CFT073</sub>	12 (92.3)	1 (7.7)	13 (27.1)	<0.001
PAI I <sub>J96</sub>	-	-	-	-
PAI II <sub>J96</sub>	5 (100.0)	-	5 (10.4)	0.010

Chi square test. Data expressed as absolute number (%).

### Genetic Correlation Between *E. coli* Blood Strains

Analysis of genetic variability using the ERIC-PCR technique demonstrated the presence of two major clonal lineages and several isolates not related to each other (**Figure 1**). A more detailed analysis verified that the two lineages are statistically different in relation to the antimicrobial resistance profile (**Table 4**). The difference was significant for ESBL production and presence of genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. In addition, the two clonal groups showed statistical difference in a single FV, the gene *KpsMT* K5. The most prevalent phylogenetic group remained the B2 group in the two clonal groups and presented similar prevalence in the other phylogroups (**Table 5**).

**Table 4.** Comparison of virulence factors, pathogenicity islands and resistance profile between two clonal groups.

Genetic determinants	Clonal group 1 (n=15)	Clonal group 2 (n=8)	Total	p value
<b>Virulence factor, n (%)</b>				
<i>fimH</i>	13 (61.9)	8 (38.1)	21 (91.3)	-
<i>afa</i>	1 (50.0)	1 (50.0)	2 (8.7)	-
<i>papC</i>	5(33.3)	4 (50.0)	9 (39.1)	-
<i>papG</i>	-	-	-	-
<i>sfaA</i>	5(55.6)	4 (44.4)	9 (39.1)	-
<i>sfaS</i>	1 (50.0)	1 (50.0)	2 (8.7)	-
<i>iutA</i>	8 (57.1)	6 (42.9)	14 (60.9)	-
<i>iroN</i>	6 (60.0)	4 (40.0)	10 (43.5)	-
<i>fyuA</i>	12 (70.6)	5 (29.4)	17 (73.9)	-
<i>cvaC</i>	5 (62.5)	3 (37.5)	8 (34.8)	-
<i>traT</i>	11 (61.1)	7 (38.9)	18 (78.3)	-
<i>iss</i>	4 (66.7)	2 (33.3)	6 (26.1)	-
<i>ibeA</i>	-	-	-	-
<i>kpsMT</i> k1	1 (100.0)	-	1 (4.3)	-
<i>KpsMT</i> k5	1 (20.0)	4 (80.0)	5 (21.7)	0.016
<i>kpsMT</i> II	5 (50.0)	5 (50.0)	10 (43.5)	-
<i>kpsMT</i> III	1 (100.0)	-	1 (4.3)	-
<i>ompT</i>	4 (66.7)	2 (33.3)	6 (26.1)	-
<i>hlyF</i>	4 (66.7)	2 (33.3)	6 (26.1)	-

<i>hlyA</i>	1 (25.0)	3 (75.0)	4 (17.4)	-
<i>cnf1</i>	1 (25.0)	3 (75.0)	4 (17.4)	-
<i>cnf2</i>	-	-	-	-
<b>Pathogenicity islands, n (%)</b>				
PAI I536	1 (25.0)	3 (75.0)	4 (17.4)	-
PAI II536	-	1 (100.0)	1 (4.3)	-
PAI III536	1 (50.0)	1 (50.0)	2 (8.7)	-
PAI IV536	14 (73.7)	5 (26.3)	19 (82.6)	-
PAI ICFT073	8 (68.7)	5 (31.3)	13 (56.5)	-
PAI IICFT073	4 (57.1)	3 (42.9)	7 (30.4)	-
PAI IJ96	-	-	-	-
PAI IJ96	1 (33.3)	2 (66.7)	3 (13.0)	-
<b>Resistance profile, n (%)</b>				
<b>ESBL</b>	-	4 (100.0)	4 (17.4)	0.003
CTX-M-1	-	4 (100.0)	4 (17.4)	0.003
CTX-M-15	-	3 (100.0)	3 (13.0)	0.006
CTX-M-9	-	1 (100.0)	1 (4.3)	-
CTX-M-25	-	1 (100.0)	1 (4.3)	-
<b>KPC</b>	-	1 (100.0)	1 (4.3)	-

Chi-square Test. Data expressed as absolute number (%).

**Table 5.** Phylogenetic classification among isolates belonging to clonal groups.

	Phylogenetic groups					<i>p value</i>
	B1	B2	D	E	NG*	
Clonal group 1	3 (20.0%)	8 (53.3%)	1 (6.7%)	1 (6.7%)	2 (13.3%)	>0.05
Clonal group 2	3 (37.5%)	4 (50.0%)	-	1 (12.5%)	2 (25.5%)	>0.05

Chi-square Test. Data expressed as absolute number (%). \*NG (Not grouped).

## Discussion

### Demographic and Clinical Characteristics

ExPEC is a very important bacterium involved in bloodstream infection and in severe cases it may lead to death (OWRANGI et al., 2018). For characterization of this infection, it is necessary to consider the bacterial determinants, such as virulence factors, as well as antimicrobial resistance and host determinants (JAURÉGUY et al., 2007; LEFORT et al., 2011). The understanding and characterization of these factors may facilitate the development of new strategies for the treatment of *E. coli* bloodstream infections.

The presence of intestinal diseases was very prevalent among patients (25.0%). It is possible for ExPEC to initiate systemic infections by causing sepsis or bacteremia through abdominal translocation in patients with some intestinal disease (VAISHNAVI, 2013). Diabetes was also a common comorbidity with 18.8% of prevalence. Studies have reported an association between diabetes and pyelonephritis by *E. coli* and the increased risk of complications such as renal abscess and necrosis (ALVES et al., 2012).

Immunosuppression is an important factor to consider and it is defined as the use of immunosuppressive therapy (steroid treatment, other immunosuppressor drugs, immunomodulating agents or chemotherapy) and/or the presence of any immunosuppressive illness (cancer, hematological malignancy, HIV infection) (MORA-RILLO et al., 2015). Considering these parameters, the total percentage of immunosuppressed patients was 27.1%.

These infections usually occur as complications of infections of the urinary or gastrointestinal tract, or as complications of other infections (MICENKOVÁ et al., 2017). In this study, 24 (50.0%) of the bloodstream infections had urinary origin and 6 (12.5%) had abdominal origin. Five of 6 patients with bacteremia of abdominal origin had some abdominal disease and one had hepatic cirrhosis. Patients with hepatic cirrhosis had risk of bacteremia due to an altered immune system and an increased bacterial translocation (LEFORT et al., 2011), and 8 of 9 patients with diabetes had bacteremia of urinary origin.

The mortality associated with bacteremia by *E. coli* was 16.6%. According to Russo et al. (2003) *E. coli* bacteremia had a case-fatality rate of 5 to 30% and represents an increasingly important endemic problem, accounting for hundreds of thousands of lives lost and billions of health care dollars spent each year (LEFORT et al., 2011). The age is considered a risk factor and studies have found a relationship between patients over 65 years of age and mortality (Lefort et al., 2011). The results showed that 23 (47.9%) of patients were over 65 years old, however, there was no relation with mortality. The size of our strain collection may have limited our ability to establish associations, since Lefort et al (2013) included 1.051 patients in the study.

## Phylogenetic Classification, Virulence Factors and Pathogenicity Islands Distribution

Bacterial determinants were also important to characterization of bacteremia. Phylogenetic classification of ExPEC isolates can be performed based on the detection of the *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA* genes, and DNA fragment known as TSPE4.C2 (CLERMONT et al., 2013). We detected B2 (45.8%) and B1 (18.8%) as the most prevalent phylogenetic groups among ExPEC isolates. In other studies, B2 was reported to be most common phylogenetic group in ExPEC (KOGA et al., 2014; MICENKOVÁ et al., 2017).

Phylogenetic groups B2 and D of ExPEC have higher virulence in humans that allows them to induce extraintestinal infections in healthy and compromised hosts (FRATAMICO et al., 2016). In this study was found a lower prevalence of group D (2.1%), however, 14.6% of the isolates were classified in group E. This prevalence can be explained, because in the old classification of Clermont et al. (2000), there was no distinction between groups D and E, all strains were classified as group D. The presence of B1 and E isolates in bloodstream infections shows that this group is also capable of causing systemic infections, although reports in the literature that isolates belonging to groups A and B1 are more often strictly commensal strains from the intestinal microbiota (SKJØT-RASMUSSEN et al., 2012; USEIN et al., 2016).

One of the mechanisms responsible for the survival of *E. coli* strains in the bloodstream is the escape of the complement system through the serum resistance (MIAJLOVIC; SMITH, 2014; MICENKOVÁ et al., 2017). Multiple virulence factors have been shown to be involved in serum survival. In this study, 41 (85.4%) isolates of *E. coli* had one or more genes related to serum resistance and *traT* gene presented a high prevalence among isolates (77.1%). Similar results were found in studies on *E. coli* bloodstream infection (BOZCAL et al., 2018; KOGA et al., 2014; MIAJLOVIC et al., 2016). Among the capsules researched, group 2 (*KpsMT II*) was the most prevalent (45.8%) that coding K1 and K5 capsules (RUSSO et al., 1998) and 10 (20.8%) of isolates presented the K5 specific capsule. In total, 23 (47.9%) of the *E. coli* isolates showed at least one capsule.

These polysaccharide antigens have been shown important for resistance to host's immune responses in systemic infections (MIAJLOVIC; SMITH, 2014). The K5 is involved in the pathogenesis of extraintestinal infections such as bacteremia,

urinary tract infection, and neonatal meningitis (BLUNDELL et al., 2009) In addition, the K5 capsule confers resistance to both the innate and the adaptive human immune system. According to Blundell et al. (2009), the K5 capsule is chemically similar to heparan sulfate (present in the extracellular matrix of mammals), this mimicry is probably what contributes to the ability to escape from the immune system, thus conferring high virulence to the isolates of *E. coli*. As well as K5 capsule, K1 capsule is associated with *E. coli* strains causing neonatal meningitis, K1 *E. coli* strains may cause high levels of bacteremia, leading to meningeal invasion (KIM, 2016).

Iron is a necessary element in virtually all microorganisms and is utilized to catalyze a wide variety of indispensable enzymatic reactions, but iron is also essential to host cells. However, the affinities of bacterial siderophores to iron are generally much higher than those of host proteins/molecules, allowing pathogens to outcompete the host in iron acquisition (WILSON, 2017). These siderophores systems are commonly associated with ExPEC and those isolated from bacteremia (BOZCAL et al., 2018; KOGA et al., 2014). In the present study, yersiniabactin (*fyuA*) was the most prevalent, present in 70.8% of the isolates tested. The *fyuA* gene product is involved in the efficient uptake of iron from the bloodstream (ANANIAS; YANO, 2008) and in invasion of the bloodstream from the urinary tract (JOHNSON; STELL, 2000). Lefort et al. (2011) have reported results regarding *fyuA* and mortality, he found *fyuA* more frequently in survivors (78.09% vs. 66.18%,  $p=0.0025$ ).

Genes corresponding to other iron uptake systems were also identified: *iutA* encoding the aerobactin receptor was present in 64.3% of isolates, and *iroN* encoding the salmochelin receptor was found in 37.5% of isolates. These results corroborate those found in the literature (BOZCAL et al., 2018; MIAJLOVIC et al., 2016) and strengthen the concept that iron uptake systems are essential for survival of ExPEC in the blood.

In this study, genes related to adhesins were researched and included type 1 fimbria (*fimH*), P fimbria (*papC* and *papG*), Dr binding adhesin (*afa*), S fimbria (*sfaA* and *sfaS*). The most prevalent was *fimH* (95.8%). FimH is a crucial factor for the virulence of uropathogenic *E. coli* strains by mediating adhesion to uroepithelial proteins (DALE; WOODFORD, 2015) and the bacteremia usually occur as complications of infections of the urinary tract (LAUPLAND, 2013). The second most prevalent adhesin gene was *papC* and is also involved in urinary tract infection and

subsequent bacteremia (LEFORT et al., 2011; SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

Ananias et al. (2008) reported the association of *papC* with *fyuA* could be the minimal prerequisite for bacterial passage from a renal focus of infection into the bloodstream of non-compromised patients, attached to *kpsMT* II or another capsule or protectin.

In this study, genes related to toxin and hemolysin production were researched and included *cnf2*, *cnf1*, *hlyA*, *hlyF*, *cvaC* and *ibeA*. The *cvaC* and *hlyA* gene are frequently detected in ExPEC (KOGA et al., 2014). The prevalence of colicin V (*cvaC*) was 31.3%. Its role in the pathogenesis of bloodstream infection is not well determined, but the *cvaC* inhibits the cell growth of other bacteria, reducing competition for nutrients in conditions of scarcity or stress (GÉRARD et al., 2005) and it is present on the ColV plasmid, which is known to encode the aerobactin iron uptake system as well as serum resistance (MOKADY et al., 2005). According to Nedialkova et al. (2014), colicin production is a common trait in *E. coli* populations and on average, 30% of natural *E. coli* populations produce one or more colicins.

The toxin  $\alpha$ -hemolysin (*hlyA*) was present in 14.6% of isolates. This toxin inciting a noxious inflammatory response, thereby causing clinical disease. *E. coli* HlyA is a pore-forming bacterial exotoxin that may contribute to the virulence of bacteria during bloodstream infection and sepsis (SONNEN; HENNEKE, 2013). Bonacorsi et al. (2006) found that, in infants younger than 90 days, the presence of *hlyA* and/or *iroN*, as was that of *hlyA* and/or antigen K1, it was associated with strains causing urinary tract infections with bacteremia.

Virulence genes are mainly organized in large clusters called pathogenicity islands (PAI) or plasmids on integrated in the genome that, by horizontal gene transfer, explain the notable plasticity of *E. coli* genome (PHILLIPS-HOULBRACQ et al., 2018). Thirty-nine (81.3%) of the isolates were positive for one or more PAI and the most prevalent was PAI IV<sub>536</sub> (77.1%). This PAI is considered an island of high pathogenicity and it is associated with the synthesis and transport of yersiniabactina siderophore, one of the main bacterial iron uptake systems (DOBRINDT et al., 2002). This information is confirmed by the presence of the *fyuA* gene in 70.8% and all the isolates that was positive for *fyuA* was also positive for PAI IV<sub>536</sub>. PAIs were found primarily in strains of uropathogenic *E. coli* and the high prevalence among the *E. coli* isolated of bloodstream infections can be associated with the fact that the urinary

tract infection is one of the most common infections and bacteremia is often a complication of this infection.

Ten (20.8%) isolates showed positivity for the *cvaC*, *hlyF*, *iron*, *iss*, and *ompT* genes. The presence of these genes together with the genes encoding salmochelin, aerobactin, and the iron–uptake system SitABC, was a signature of a conserved virulence plasmidic (CVP) (LEMAÎTRE et al., 2013). The phylogenetic classification of these isolates showed that commensal strains also have virulence determinates that cause extraintestinal infections. Only 3 out of the 10 isolates were classified in B2 group.

Our results demonstrated that group B2 had the highest frequency regarding both virulence genes and PAIs markers compared to the non-B2 group. Three of the 4 polysaccharide capsules (*KpsMT* K1, *KpsMT* K5, *KpsMT* II) studied were more prevalent in the isolates of group B2. The genes *papC*, *fyuA*, *hlyA*, and *cnf1* were also statistically more prevalent in group B2 isolates. Likewise, 5 out of the 8 PAIs studied were statistically more prevalent in the isolates of group B2. These results represent the ability of group B2 isolates to cause extraintestinal infections, such as infection of the bloodstream (JOHNSON; RUSSO, 2002; KÖHLER; DOBRINDT, 2011).

### **ERIC-PCR and Resistance Profile**

Analysis of genetic variability using the ERIC-PCR technique demonstrated the presence of two clonal lineages and several isolates not related to each other. A lineage composed of 8 isolates, of which 7 isolates were positive for the presence of *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, and another lineage composed of 15 isolates non-ESBL producer. The results no showed statistical difference between the two strains in relation to the other antimicrobials tested and in relation to virulence determinates, except for *KpsMT* K5 which was more prevalent in the clonal lineage that presented a resistance profile to  $\beta$ -lactams.

In this study, 16.7% (n=8) of isolates were ESBL producers and positive for the presence of the *bla*<sub>CTXM</sub> gene. CTX-M enzymes have become the predominant ESBLs encountered in the clinic and rapid dissemination of ESBL is an alarming trend and considered to be one of the world's main health threats (YAIR; GOPHNA, 2012). It was previously reported that CTX-M-producing *E. coli* isolates often carry resistance to additional antibiotic classes, which can include co-trimoxazole,

aminoglycosides, and fluoroquinolones (PITOUT; LAUPLAND, 2008). Six of the 8 isolates showed resistance to sulfamethoxazole-trimethoprim and aminoglycosides, and all isolates showed resistance to ciprofloxacin.

The prevalence of antimicrobial resistance is lower among strains belonging to B2 phylogenetic group, suggesting a trade-off between resistance and virulence (CLERMONT et al., 2008). Our results show that only 2 isolates of 22 classified in group B2 were ESBL producers and 9 of 14 isolates sensitive to all antibiotics belonged to group B2. The rate of *E. coli* isolated from the bloodstream and producing ESBL is quite variable. Miajlovic et al. (2016) found a prevalence of 40% of ESBL in Ireland, however, Burdet et al. (2014) and Namikawa et al. (2017) found a lower prevalence, 3.6% and less than 10.0%, respectively. In Brazil, Seki et al. (2013) found a prevalence of 15% of ESBL and 55% were producers of CTX-M-15. We found similar prevalence, 16.6% of ESBL and 62.5% of CTX-M-15.

## Conclusion

In summary, these results indicate that the bloodstream infection process can be mediated by several alternative VFs, and each strain may have a unique combination of these factors. This variety of virulence genes can be explained by several genetic factors that contribute to genome plasticity, such as plasmids, phages, and transposable elements. Although phylogenetic group B2 corresponds with virulence potential, our results show that isolates of B1 (commensal) and E groups are also capable of causing extraintestinal infection and the VFs carried by these strains appear to be more important in determining pathogenic potential than is the organism's phylogenetic background. Other important factors to be considered in the pathogenesis of *E. coli* bloodstream infection are the host characteristics, such as portal of entry and comorbidities. Likewise, the resistance profile is important information for the management and treatment of patients with *E. coli* bloodstream infection. Among ESBL-producing *E. coli* isolates, the CTX-M-1 group (CTX-M-15) had a high prevalence, and some of the more recent resistance mechanisms, such as ESBL CTM-M-15, arose from called high-risk clones, that facilitate the persistence and spread of resistance around the world. Then, this study was important because showed clinical and molecular characteristics of *E. coli* bloodstream infection from Brazilian isolates.

## References

- ALVES, C.; CASQUEIRO, J.; CASQUEIRO, J. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 7, p. 27, 2012.
- ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of Escherichia coli isolated from patients with sepsis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 10, p. 877–883, 2008.
- BONACORSI, S. et al. Comparative prevalence of virulence factors in Escherichia coli causing urinary tract infection in male infants with and without bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 1156–1158, 2006.
- BOZCAL, E. et al. The relationship between phylogenetic classification, virulence and antibiotic resistance of extraintestinal pathogenic Escherichia coli in Izmir province, Turkey. **Journal of Life and Environmental Sciences**, v. 6, p. e5470, 2018.
- BRADFORD, P. A. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant Klebsiella Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30  $\beta$ -Lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, p. 55–60, 2004.
- BURDET, C. et al. Escherichia coli bacteremia in children age and portal of entry are the main predictors of severity. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 8, p. 872–879, 2014.
- CIEZA, R. J. et al. The IbeA invasin of adherent-invasive Escherichia coli mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1904–1918, 2015.
- CLERMONT, O. et al. The CTX-M-15-producing Escherichia coli diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1024–1028, 2008.
- CLERMONT, O. et al. The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.
- CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.
- DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC): Disease, carriage and clones. **Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 615–626, 2015.
- DE KRAKER, M. E. A. et al. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: Trends from the European antimicrobial resistance surveillance system. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 9, p. 860–868, 2013.
- DIACOVICH, L.; GORVEL, J.-P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 117–128, 2010.
- DOBRINDT, U. et al. Genetic Structure and Distribution of Four Pathogenicity Islands (PAI I536 to PAI IV536) of Uropathogenic Escherichia coli Strain 536. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6365–6372, 2002.

FRATAMICO, P. M. et al. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–8, 2016.

FROMMEL, U. et al. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 5814–5829, 2013.

GALL-MAS, L. et al. The bacterial toxin CNF1 induces activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1–11, 2018.

JAURÉGUY, F. et al. Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 9, p. 854–862, 2007.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E coli*”. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, n. 3, p. 155–162, 2002.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000a.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise James. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 261–272, 2000b.

KACZMAREK, A.; BUDZYŃSKA, A.; GOSPODAREK, E. Detection of K1 antigen of *Escherichia coli* rods isolated from pregnant women and neonates. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 5, p. 419–422, 2014.

KIM, K. S. Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v. 59, n. 3, p. 157–161, 2016.

KOGA, V. L. et al. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, 2011a.

KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, 2011b.

LAUPLAND, K. B. Incidence of bloodstream infection: A review of population-based studies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 6, p. 492–500, 2013.

LEFLON-GUIBOUT, V. et al. Emergence and spread, of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3736–3742, 2004.

- LEFORT, A. et al. Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 777–783, 2011.
- MARRA, A. R. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: Analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866–1871, 2011.
- MIAJLOVIC, H. et al. Characterization of *Escherichia coli* bloodstream isolates associated with mortality. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 71–79, 2016.
- MIAJLOVIC, H.; SMITH, S. G. Bacterial self-defence: How *Escherichia coli* evades serum killing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, n. 1, p. 1–9, 2014.
- MICENKOVÁ, L. et al. Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 3, p. 182–189, 2017.
- MOBLEY, H. L. T.; SUBASHCHANDRABOSE, S. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 4, 2015.
- MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E. Z. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6–7, p. 455–462, 2005.
- MORA-RILLO, M. et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 93–100, 2015.
- NAMIKAWA, H. et al. Clinical Characteristics of Bacteremia Caused by Extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Escherichia coli* at a Tertiary Hospital. **Internal Medicine**, v. 56, n. 14, p. 1807–1815, 2017.
- OWRANGI, B. et al. Invasion and translocation of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urosepsis and patients with community-acquired urinary tract infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p. 833–839, 2018.
- PETKOVSEK, Z. et al. **Virulence Potential of *Escherichia coli* Isolates from Skin and Soft Tissue Infections** *Journal of Clinical Microbiology*, 2009.
- PHILLIPS-HOULBRACQ, M. et al. Pathophysiology of *Escherichia coli* pneumonia: Respective contribution of pathogenicity islands to virulence. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 2, p. 290–296, 2018.
- PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. **Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern** *The Lancet Infectious Diseases*, 2008.
- RON, E. Z. Distribution and evolution of virulence factors in septicemic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 6, p. 367–370, 2010.

- RUSSO, T. A. et al. Identification, genomic organization, and analysis of the group III capsular polysaccharide genes *kpsD*, *kpsM*, *kpsT*, and *kpsE* from an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (CP9, O4/K54/H5). **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 2, p. 338–349, 1998.
- RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 449–456, 2003.
- SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical microbiology and infection**, v. 12, n. 9, p. 880–6, 2006.
- SANNES, M. R. et al. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. **J.Infect.Dis.**, v. 190, p. 2121–2128, 2004.
- SEKI, L. M. et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: Emergence of CTX-M-15. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 640–646, 2013.
- SHAIK, S. et al. Comparative Genomic Analysis of Globally Dominant ST131 Clone with Other Epidemiologically Successful. **mBio**, v. 8, n. 5, p. e01596-17, 2017.
- SKJØT-RASMUSSEN, L. et al. Virulence factors and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from patients with bacteraemia of urinary tract origin relate to sex and hospital- vs. community-acquired origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 3, p. 129–134, 2012.
- SONNEN, A. F. P.; HENNEKE, P. Role of pore-forming toxins in neonatal sepsis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.
- USEIN, C. R. et al. Molecular characterization of bacteremic *Escherichia coli* isolates in Romania. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 3, p. 221–226, 2016.
- VAISHNAVI, C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 334, 2013.
- VIANA TAVEIRA, M. R. et al. Risk factors for central line-associated bloodstream infection in pediatric oncology patients with a totally implantable venous access port: A cohort study. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 64, n. 2, p. 336–342, 2017.
- WILSON, B. R. ET AL. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. **Trends Mol Med**, v. 22, n. 12, p. 1077–1090, 2017.
- WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases [4]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154–155, 2006.
- YAIR, Y.; GOPHNA, U. Pandemic Bacteremic *Escherichia Coli* Strains: Evolution and Emergence of Drug-Resistant Pathogens. v. 5, n. 3, p. 629–634, 2012.
- YOKOTA, P. K. O. et al. Outcomes and Predictive Factors Associated with Adequacy of Antimicrobial Therapy in Patients with Central Line-Associated Bloodstream Infection. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. December, p. 1–5, 2016.

## 5 CONCLUSÃO

Apesar de *E. coli* não estar entre os agentes etiológicos mais frequentes em infecções da corrente sanguínea, é o BGN mais prevalente em ITU, tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar. A ITU é a principal porta de entrada para a infecção da corrente sanguínea por *E. coli*. De acordo com os resultados deste estudo metade das infecções foram secundárias à ITU. Além disso, foi possível concluir que *E. coli* de sangue possui um arsenal de fatores de virulência que permite com que estabeleça infecção em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos, dentre esses FVs, os mais prevalentes e também essenciais estão envolvidos na síntese de adesinas e associados à resistência sérica e à capacidade de captação e absorção de ferro.

A análise da variabilidade genética de *E. coli* de sangue demonstrou a presença de grupos clonais principais e vários isolados não relacionados, sendo que, esses grupos diferiram na análise do perfil de resistência. Em geral, os isolados de sangue apresentaram alta taxa de resistência para ampicilina, ampicilina-sulbactam, sulfametoxazol-trimetoprim e ciprofloxacino, além disso, dentre os isolados produtores de ESBL, o grupo CTX-M-1 (CTX-M-15) foi o mais prevalente.

A análise filogenética dos isolados dos diferentes materiais clínicos permitiu concluir que, embora o grupo filogenético corresponda ao potencial de virulência (B2 e D), *E. coli* dos filogrupos A e B1 também são capazes de causar infecção extraintestinal e os FVs presentes nessas linhagens parecem ser mais importantes na determinação do potencial patogênico do que a própria filogenia. Além disso, os isolados classificados anteriormente como sendo do grupo D, pertencem na verdade ao grupo E.

Comparando-se os isolados dos diferentes materiais clínicos foi possível estabelecer que *E. coli* de sangue e líquidos/secreções tiveram maior prevalência de genes envolvidos na resistência sérica do que *E. coli* urinária, sendo que estes FVs são essenciais para a sobrevivência no sangue. Outra diferença significativa entre *E. coli* urinária e isolados de sangue e líquidos/secreções, foi a maior prevalência do filogrupo A em isolados de urina. Esses isolados, provavelmente, se originaram da microbiota intestinal. A prevalência de FVs foi significativamente maior em *E. coli* de ITU adquirida na comunidade do que em isolados de ITU de pacientes internados, portanto o potencial patogênico dos isolados de ITU adquirida na comunidade foi maior do que dos isolados de ITU de pacientes internados.

## REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, J. et al. Epidemiology of Escherichia coli bacteraemia in England: results of an enhanced sentinel surveillance programme. **Journal of Hospital Infection**, v. 95, n. 4, p. 365–375, 2017.
- ABERNETHY, J. K. et al. Thirty day all-cause mortality in patients with Escherichia coli bacteraemia in England. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 3, p. 251.e1-251.e8, 2015.
- ABREU, A. G.; BARBOSA, A. S. How Escherichia coli circumvent complement-mediated killing. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 452, p. 1–6, 2017.
- AHMED, ASHRAF M; SHIMAMOTO, TOSHI; SHIMAMOTO, T. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic Escherichia coli isolated from septicemic broilers. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 8, p. 475–483, 2013.
- AKTAŞ, E. et al. A First Insight into Escherichia coli ST131 High-Risk Clone Among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Urine Isolates in Istanbul with the Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry and Real-Time PCR. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 8, p. 1032–1036, 2017.
- ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of Escherichia coli isolated from patients with sepsis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 10, p. 877–883, 2008.
- ANDERSON, K. L. et al. An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesins. **Molecular Cell**, v. 15, n. 4, p. 647–657, 2004.
- ARVAND, M.; MOSER, V.; PFEIFER, Y. Prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2686–2688, 2013.
- AYDIN TEKE, T. et al. Clinical and microbiological features of resistant gram-negative bloodstream infections in children. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 2, p. 211–218, 2017.
- AZPIROZ, M. F.; POEY, M. E.; LAVIÑA, M. Microcins and urovirulence in Escherichia coli. **Microbial Pathogenesis**, v. 47, n. 5, p. 274–280, 2009.
- BALSALOBRE, C. et al. Transcriptional analysis of the sfa determinant revealing multiple mRNA processing events in the biogenesis of S fimbriae in pathogenic Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 2, p. 620–629, 2003.
- BÄUMLER, A. J. et al. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of Salmonella enterica. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 6, p. 1446–1453, 1998.
- BERRY, R. E.; KLUMPP, D. J.; SCHAEFFER, A. J. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2762–2772, 2009.

- BHAKDI, S. et al. Potent leukocidal action of Escherichia coli hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 3, p. 737–754, 1989.
- BHUSHAN, S. et al. Uropathogenic E. coli induce different immune response in testicular and peritoneal macrophages: Implications for testicular immune privilege. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1–15, 2011.
- BIN THANI, A. S. Identification of novel DNA sequence associated with pathogenicity island III536 locus in Uropathogenic Escherichia coli isolate and distribution of virulence determinants in  $\beta$ -lactam resistant isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, n. July, p. 393–397, 2018.
- BINNS, M. M.; DAVIES, D. L.; HARDY, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, v. 279, n. 5716, p. 778–781, 1979.
- 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. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 2, p. 654–659, 1982.
- BLUNDELL, C. D. et al. Investigating the molecular basis for the virulence of Escherichia coli K5 by nuclear magnetic resonance analysis of the capsule polysaccharide. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 71–82, 2009.
- BONACORSI, S. et al. Comparative prevalence of virulence factors in Escherichia coli causing urinary tract infection in male infants with and without bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 1156–1158, 2006.
- BOUCKAERT, J. et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli FimH adhesin. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 441–455, 2005.
- BOZCAL, E. et al. The relationship between phylogenetic classification, virulence and antibiotic resistance of extraintestinal pathogenic Escherichia coli in İzmir province, Turkey. **Journal of Life and Environmental Sciences**, v. 6, p. e5470, 2018.
- BRADFORD, P. A. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant Klebsiella Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30  $\beta$ -Lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, p. 55–60, 2004.
- BRAUN, V. IRON UPTAKE BY ESCHERICHIA COLI Volkmar. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 1409–1421, 2003.
- BRAUN, V.; BRAUN, M. Iron transport and signaling in Escherichia coli. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 78–85, 2002.
- BRAUN, V.; HANTKE, K. Recent insights into iron import by bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 2, p. 328–334, 2011.
- BUCKLES, E. L. et al. Role of the K2 capsule in Escherichia coli urinary tract infection and serum resistance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 11, p. 1–18, 2009.

- CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466–475, 2006.
- CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the Escherichia coli phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 214–226, 2012.
- CIEZA, R. J. et al. The IbeA invasin of adherent-invasive Escherichia coli mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1904–1918, 2015.
- CLERMONT, O. et al. Animal and human pathogenic Escherichia coli strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 654–662, 2011.
- CLERMONT, O. et al. The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 2010.
- D'ANDREA, M. M. et al. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 305–317, 2013.
- DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC): Disease, carriage and clones. **Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 615–626, 2015.
- DE KRAKER, M. E. A. et al. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: Trends from the European antimicrobial resistance surveillance system. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 9, p. 860–868, 2013.
- DHAKAL, BIJAYA K.; MULVEY, M. A. The UPEC Pore Forming Toxin  $\alpha$ -Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory and Survival Pathways. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 1, p. 58–69, 2011.
- DISSANAYAKE, D. R. A.; OCTAVIA, S.; LAN, R. Population structure and virulence content of avian pathogenic Escherichia coli isolated from outbreaks in sri lanka. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 2–4, p. 403–412, 2014.
- DOBRINDT, U. et al. S-fimbria-encoding determinant *sfal* is located on pathogenicity island III536 of uropathogenic Escherichia coli strain 536. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4248–4256, 2001.
- DOBRINDT, U. et al. Genetic Structure and Distribution of Four Pathogenicity Islands (PAI I536 to PAI IV536) of Uropathogenic Escherichia coli Strain 536. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6365–6372, 2002.
- DUGUID, J.P; SMITH, ISABEL W.; DEMPSTER, G.; EDMUNDS, P. N. NON-FLAGELLAR FILAMENTOUS APPENDAGES (" FIMBRIZ ") AND HBMAGGLUTINATING ACTIVITY IN BACTERI UIkf COLI. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 70, n. 2, p. 335–348, 1954.
- EMODY, L.; KERÉNYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. SUPPL. 2, 2003.

- EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163–176, 2007.
- FEGLO, P. et al. Emergence of a novel extended-spectrum- $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing, fluoroquinolone-resistant clone of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in Kumasi, Ghana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 728–730, 2013.
- FERACO, D. et al. Host environmental signals and effects on biofilm formation. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 253–263, 2016.
- FISCHER, H. et al. Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: Fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 267–277, 2006.
- FRENDÉUS, B. et al. *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 37–51, 2001.
- FRÖMMEL, U. et al. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 5814–5829, 2013.
- GALL-MAS, L. et al. The bacterial toxin CNF1 induces activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1–11, 2018.
- GARÉNAUX, A.; CAZA, M.; DOZOIS, C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 89–98, 2011.
- GÉRARD, F.; PRADEL, N.; WU, L. F. Bactericidal activity of colicin V is mediated by an inner membrane protein, SdaC, of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 6, p. 1945–1950, 2005.
- GERMON, P. et al. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1179–1186, 2005.
- GIBSON, F.; MAGRATH, D. I. THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A HYDROXAMIC ACID (AEROBACTIN) FORMED BY *AEROBACTER AEROGENES* 62-1. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 92, n. 2, p. 17–184, 1969.
- GONÇALVES, L. F. et al. Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 6, p. 1–4, 2016.
- GORDON, D. M. The Influence of Ecological Factors on the Distribution and the Genetic Structure of *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v. 1, n. 1, 2004.
- GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: Multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484–2496, 2008.

GRAY, J. Epidemiology of Escherichia coli bloodstream infections in children. **Journal of Hospital Infection**, v. 95, n. 4, p. 383–384, 2017.

GRAY, J.; OPPENHEIM, B.; MAHIDA, N. Preventing healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, n. 3, p. 225–227, 2018.

GUR, C. et al. Natural killer cell-mediated host defense against uropathogenic E. coli is counteracted by bacterial hemolysinA-dependent killing of NK cells. **Cell Host and Microbe**, v. 14, n. 6, p. 664–674, 2013.

HACKER, JORG; BENDER, LARISA; OTT, MANFRED; WINGENDER, JOCHEN; LUND, BJORN; MARRE, REINHARD; GOEBEL, W. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal Escherichia coli isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 8, p. 213–225, 1990.

HANTKE, K. et al. Salmochelins, siderophores of Salmonella enterica and uropathogenic Escherichia coli strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 3677–3682, 2003.

HAYWARD, R. D. et al. Exploiting pathogenic Escherichia coli to model transmembrane receptor signalling. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 358–370, 2006.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 637–657, 2010.

HILBERT, D. W. et al. Clinical Escherichia coli isolates utilize alpha-hemolysin to inhibit in vitro epithelial cytokine production. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 7–8, p. 628–638, 2012.

HOCHHUT, B. et al. Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic Escherichia coli strain 536. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 584–595, 2006.

HOCHHUT, B.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Pathogenicity Islands and Their Role in Bacterial Virulence and Survival. **Concepts in Bacterial Virulence**, v. 12, p. 234–254, 2004.

HOLDEN, N. J. et al. Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic Escherichia coli. **Microbiology**, v. 152, n. 4, p. 1143–1153, 2006.

HOLDEN, V. I.; BACHMAN, M. A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 986–995, 2015.

HUANG, S. H. et al. Further characterization of Escherichia coli brain microvascular endothelial cell invasion gene ibeA by deletion, complementation, and protein expression. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 7, p. 1071–8, 2001.

HUANG, S. H.; STINS, M. F.; KIM, K. S. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 10, p. 1237–1244, 2000.

- HUI, C. Y. et al. Escherichia coli outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 8, p. 452–459, 2010.
- HUNSTAD, D. A. et al. Suppression of bladder epithelial cytokine responses by uropathogenic Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 3999–4006, 2005.
- JAKES, K. S.; CRAMER, W. A. Border Crossings: Colicins and Transporters. **Annual Review of Genetics**, v. 46, n. 1, p. 209–231, 2012.
- JOHNSON, J. R. Virulence Factors in Escherichia coli Urinary Tract Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 80–128, 1991.
- JOHNSON, J. R. et al. Phylogenetic Distribution of Virulence-Associated Genes among *Escherichia coli* Isolates Associated with Neonatal Bacterial Meningitis in The Netherlands. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 6, p. 774–784, 2002.
- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of Escherichia coli Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise James. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 261–272, 2000a.
- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000b.
- JOHNSON, T. J. et al. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian Escherichia coli strains. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 745–758, 2006.
- JONAS, D. et al. Cytocidal effects of Escherichia coli hemolysin on human T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 5, p. 1715–1721, 1993.
- KACZMAREK, A.; BUDZYŃSKA, A.; GOSPODAREK, E. Detection of K1 antigen of Escherichia coli rods isolated from pregnant women and neonates. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 5, p. 419–422, 2014.
- KAPER, JAMES B; NATARO, JAMES P; MOBLEY, H. L. . PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI. **NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY**, v. 2, p. 123–140, 2004.
- KIM, K. S. et al. The K1 capsule is the critical determinant in the development of Escherichia coli meningitis in the rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 3, p. 897–905, 1992.
- KIM, K. S. Human Meningitis-Associated Escherichia coli. **EcoSal Plus**, v. 59, n. 3, p. 157–161, 2016.
- KLINE, K. A. et al. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580–592, 2009.
- KNUST, Z.; SCHMIDT, G. Cytotoxic necrotizing factors (CNFs)-a growing toxin family. **Toxins**, v. 2, n. 1, p. 116–127, 2010.
- KOGA, V. L. et al. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from human blood culture in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

- KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, 2011a.
- KÖHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, 2011b.
- KOREA, C. G.; GHIGO, J. M.; BELOIN, C. The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. **BioEssays**, v. 33, n. 4, p. 300–311, 2011.
- KORHONEN, T. K.; VAISANEN-RHEN, V.; RHEN, M. *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. **Journal of Bacteriology**, v. 159, n. 2, p. 762–766, 1984.
- LAUPLAND, K. B. Incidence of bloodstream infection: A review of population-based studies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 6, p. 492–500, 2013.
- LE BOUGUÉNEC, C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6–7, p. 471–478, 2005.
- LEFLON-GUIBOUT, V. et al. Emergence and spread, of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3736–3742, 2004.
- LEFORT, A. et al. Host factors and portal of entry outweigh bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 777–783, 2011.
- LJUNGDAHL, M. et al. Bacterial translocation in experimental shock is dependent on the strains in the intestinal flora. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 35, n. 4, p. 389–397, 2000.
- LÜTHJE, P.; BRAUNER, A. Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. **Advances in Microbial Physiology**, v. 65, p. 337–372, 2014.
- MACFIE, J. et al. Gut origin of sepsis: A prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. **Gut**, v. 45, n. 2, p. 223–228, 1999.
- MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1–2, p. 2–12, 2013.
- MANSON, J. M.; GILMORE, M. S. Pathogenicity island integrase cross-talk: A potential new tool for virulence modulation. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 555–559, 2006.
- MARTIN, P. et al. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin in *Escherichia coli*. **IUBMB Life**, v. 69, n. 6, p. 435–441, 2017.
- MCNALLY, A. et al. Genomic analysis of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* urosepsis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 8, p. e328–e334, 2013.

- MENDU, D. R. et al. Protein folding intermediates of invasin protein IbeA from *Escherichia coli*. **FEBS Journal**, v. 275, n. 3, p. 458–469, 2008.
- MIAJLOVIC, H. et al. Characterization of *Escherichia coli* bloodstream isolates associated with mortality. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 71–79, 2016.
- MIAJLOVIC, H.; SMITH, S. G. Bacterial self-defence: How *Escherichia coli* evades serum killing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, n. 1, p. 1–9, 2014.
- MICENKOVÁ, L. et al. Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 3, p. 182–189, 2017.
- MORA-RILLO, M. et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 93–100, 2015.
- MURASE, K. et al. HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 11, p. 856–865, 2016.
- MURTHY, A. M. V. et al. Regulation of hemolysin in uropathogenic *Escherichia coli* fine-tunes killing of human macrophages. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 967–980, 2018.
- NAJAFI, A. et al. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 3, p. 335–343, 2018.
- NEDIALKOVA, L. P. et al. Inflammation Fuels Colicin Ib-Dependent Competition of *Salmonella* Serovar Typhimurium and *E. coli* in Enterobacterial Blooms. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, 2014.
- NÈGRE, V. L. et al. The Siderophore Receptor IroN, but Not the High-Pathogenicity Island or the Hemin Receptor ChuA, Contributes to the Bacteremic Step of *Escherichia coli* Neonatal Meningitis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 1216–1220, 2004.
- NIELSEN, S. L. et al. Decreasing incidence rates of bacteremia: A 9-year population-based study. **Journal of Infection**, v. 69, n. 1, p. 51–59, 2014.
- NIELSEN, S. L. et al. The daily risk of bacteremia during hospitalization and associated 30-day mortality evaluated in relation to the traditional classification of bacteremia. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 2, p. 167–172, 2016.
- NOUR, I. et al. Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant Gram-negative late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 97, n. 1, p. 52–58, 2017.
- OKUNO, K. et al. Utilization of *Escherichia coli* Outer-Membrane Endoprotease OmpT Variants as Processing Enzymes for Production of Peptides from Designer Fusion Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 76–86, 2004.

OTT, M. et al. Gene clusters for S fimbrial adhesin (sfa) and F1C fimbriae (foc) of *Escherichia coli*: Comparative aspects of structure and function. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 9, p. 3983–3990, 1988.

OWRANGI, B. et al. Invasion and translocation of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urosepsis and patients with community-acquired urinary tract infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p. 833–839, 2018.

PEREIRA, C. A. P. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 8–13, 2013.

PETKOVSEK, Z. et al. **Virulence Potential of *Escherichia coli* Isolates from Skin and Soft Tissue Infections** *Journal of Clinical Microbiology*, 2009.

PETTERSEN, V. K. et al. Coordination of Metabolism and Virulence Factors Expression of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Purified from Blood Cultures of Patients with Sepsis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 9, p. 2890–2907, 2016.

PHILLIPS-HOULBRACQ, M. et al. Pathophysiology of *Escherichia coli* pneumonia: Respective contribution of pathogenicity islands to virulence. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 2, p. 290–296, 2018.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. **Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern** *The Lancet Infectious Diseases*, 2008.

POMBA, C. et al. Within-lineage variability of ST131 *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the South of Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 271–273, 2014.

PREMJANI, V. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* OmpT regulates outer membrane vesicle biogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 355, n. 2, p. 185–192, 2014.

RATLEDGE, C. Iron metabolism and infection. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 28, n. 4 SUPPL., 2007.

RHODES, A. et al. **Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016**. [s.l.: s.n.]. v. 45

RIBAS, R. M.; FREITAS, C.; GONTIJO FILHO, P. P. Nosocomial bloodstream infections: organisms, risk factors and resistant phenotypes in the Brazilian University Hospital. **Braz J Infect Dis**, v. 11, n. 3, p. 351–354, 2007.

RISTOW, L. C.; WELCH, R. A. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 3, p. 538–545, 2016.

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301–311, 2016.

- RON, E. Z. Distribution and evolution of virulence factors in septicemic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 6, p. 367–370, 2010.
- ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.
- RUSSO, T. A. et al. Identification, genomic organization, and analysis of the group III capsular polysaccharide genes *kpsD*, *kpsM*, *kpsT*, and *kpsE* from an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (CP9, O4/K54/H5). **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 2, p. 338–349, 1998.
- RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753–1754, 2000.
- RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 449–456, 2003.
- SABATÉ, M. et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical microbiology and infection**, v. 12, n. 9, p. 880–6, 2006.
- SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31–37, 2016.
- SARMA, J. V.; WARD, P. A. The Compliment System. **Cell tissue research**, v. 343, n. 343(1), p. 227–235, 2012.
- SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; HEESEMANN, J. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): Evolutionary and functional aspects. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, n. 2–3, p. 83–94, 2004.
- SEKI, L. M. et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: Emergence of CTX-M-15. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 640–646, 2013.
- SERVIN, A. L. Pathogenesis of {Afa}/{Dr} diffusely adhering {*Escherichia*} coli. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 264–292, 2005.
- SERVIN, A. L. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 823–869, 2014.
- SKJØT-RASMUSSEN, L. et al. Virulence factors and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from patients with bacteraemia of urinary tract origin relate to sex and hospital- vs. community-acquired origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 3, p. 129–134, 2012.
- SMATI, M. et al. Strain-specific impact of the high-pathogenicity island on virulence in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 1, p. 44–56, 2017.
- SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134–163, 2007a.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134–163, 2007b.

SMITH, M. A. et al. Antibodies against hemolysin and cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1) reduce bladder inflammation in a mouse model of urinary tract infection with toxigenic uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1661–1673, 2015.

STENUTZ, R.; WEINTRAUB, A.; WIDMALM, G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 382–403, 2006.

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

TALAN, D. A. et al. Fluoroquinolone-Resistant and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase–Producing *Escherichia coli* Infections in Patients with Pyelonephritis, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, 2017.

TENÓRIO, M. T. F. et al. Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infections in a tertiary hospital in Maceió, Alagoas, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 175–179, 2010.

THOMASSIN, J. L. et al. OmpT outer membrane proteases of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* contribute differently to the degradation of human LL-37. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 2, p. 483–492, 2012.

VAISHNAVI, C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 334, 2013.

VAN LOY, C. P. et al. Identification of amino acids in the Dr adhesin required for binding to decay-accelerating factor. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 439–452, 2002.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade Pathogenicity islands Islas de patogenicidad. **O mundo da saúde**, v. 33, n. 4, p. 406–414, 2009.

VILA, J. et al. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 4, p. 437–463, 2016.

VILLALONGA, P.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases and cell cycle control. **Growth Factors**, v. 24, n. 3, p. 159–164, 2006.

VILLEGAS, M. V. et al. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in South America. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. SUPPL. 1, p. 154–158, 2008.

WAGENLEHNER, F. M. E.; TANDOGDUB, Z.; JOHANSEN, T. E. B. An update on classification and management of urosepsis. **Curr Opin Urol**, v. 27, n. 3, p. 133–137, 2017.

- WANG, M. H.; KIM, K. S. Cytotoxic necrotizing factor 1 contributes to Escherichia coli meningitis. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2270–2280, 2013.
- WANG, Y.; WEN, Z. G.; KIM, K. S. Role of S fimbriae in Escherichia coli K1 binding to brain microvascular endothelial cells in vitro and penetration into the central nervous system in vivo. **Microbial Pathogenesis**, v. 37, n. 6, p. 287–293, 2004.
- WHITFIELD, C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 39–68, 2006.
- WHITFIELD, C. Structure and Assembly of Escherichia coli Capsules. **EcoSal Plus**, v. 3, n. 2, 2009.
- WHITTAM, T. S.; OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of Escherichia coli. **Molecular Biology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 67–83, 1983.
- WILLIAMS, J. D. B-Lactamase Inhibition and in Vitro Activity of Sulbactam and Sulbactam/Cefoperazone. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 494–497, 1997.
- WILSON, B. R. ET AL. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. **Trends Mol Med**, v. 22, n. 12, p. 1077–1090, 2017.
- WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases [4]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154–155, 2006.
- WULLT, B. The role of P fimbriae for Escherichia coli establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 21, n. 6, p. 605–621, 2003.
- XIA, Y. et al. Regulatory cross-talk between adhesin operons in Escherichia coli: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 7, p. 1450–1457, 2000.
- XU, W.; LI, Y.; FAN, C. Different Loci and mRNA Copy Number of the Increased Serum Survival Gene of Escherichia coli. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 26, p. 293–307, 2008.
- YANG, S. et al. Genetic diversity of K-antigen gene clusters of Escherichia coli and their molecular typing using a suspension array. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 231–241, 2018.
- ZAMANI, H.; SALEHZADEH, A. Biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli: Association with adhesion factor genes. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 48, n. 1, p. 162–167, 2018.
- ZHENG, T.; NOLAN, E. M. Siderophore-based detection of Fe(III) and microbial pathogens. **Metallomics**, v. 4, n. 9, p. 866–880, 2012.
- ZOU, Y.; HE, L.; HUANG, S. H. Identification of a surface protein on human brain microvascular endothelial cells as vimentin interacting with Escherichia coli invasion protein IbeA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 351, n. 3, p. 625–630, 2006.