



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LAURA PATRICIA PEREZ ABSHANA

**COMPARAÇÃO ENTRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
Escherichia coli UROPATOGÊNICA SENSÍVEIS E
MULTIRESISTENTE AOS ANTIMICROBIANOS**

LAURA PATRICIA PEREZ ABSHANA

**COMPARAÇÃO ENTRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
Escherichia coli UROPATOGÊNICA SENSÍVEIS E
MULTIRESISTENTE AOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata K. T. Kobayashi

Londrina
2017

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C996d Abshana, Laura Perez.

**COMPARAÇÃO ENTRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli*
UROPATOGÊNICA SENSÍVEIS E MULTIRESISTENTE AOS ANTIMICROBIANOS**

/ Laura Perez Abshana. – Londrina, 2017. 51 f. : il.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.

Inclui bibliografia.

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

CDU 576.851.48

LAURA PATRICIA PEREZ ABSHANA

**COMPARAÇÃO ENTRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
Escherichia coli UROPATOGÊNICA SENSÍVEIS E
MULTIRESISTENTE AOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata K. T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

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

Londrina, 29 de março de 2017.

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

(Dalai Lama)

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus por ter me instruído nesta jornada e colocado em meu caminho as pessoas que sempre me ajudaram.

Aos meus pais Luís Perez Arregoces e Silvia Abshana Perez pela oportunidade de vida com amor, carinho, educação e apoio nos momentos mais difíceis da minha vida

Aos meus irmãos, Alicia, Adriana e Luís Ricardo Perez Abshana, pelo amor, incentivo e apoio que sempre me dedicaram.

À minha sobrinha Laurent que em tão pouco tempo trouxe tanta alegria para minha casa.

A minhas melhores amigas, Adriana Chamorro, Nohora Villamizar, Patrícia Guaman, Laura Velasques e Janneth Escobar por acreditar em mim e pela linda amizade.

À Terezinha Molleta e ao Idílio Dias pelos ótimos conselhos e por todo amor e carinho que me brindaram.

Às minhas amigas Carina Tsuruda e Rosemary Cervantes pelo carinho e amizade.

À minha orientadora, Dra. Renata Kobayashi pela confiança depositada em meu trabalho, pelos ensinamentos que auxiliaram minha aprendizagem e desenvolvimento acadêmico, assim como pela orientação neste Mestrado.

A o Professor Gerson Nakazato pelo apoio e ajuda em momentos de dúvidas e dificuldades, pelas excelentes explicações e muitas explicações e por sempre estar disposta a contribuir com minha formação profissional.

Aos professores do mestrado em Microbiologia por serem fiéis ao seu ideal de ensinar.

A todos os companheiros e amigos do mestrado pela amizade e bons momentos que contribuíram para meu aprendizado e desenvolvimento, além da alegria de uma agradável convivência.

A todos os companheiros e amigos do laboratório de Bacteriologia Aplicada pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais, amizade e bons momentos (o melhor do Occidente)

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, minha formação acadêmica e meu sonho de estudar no Brasil.

ABSHANA, L. P. **Comparação entre os fatores de virulência de *Escherichia coli* uropatogênica sensíveis e multiresistente aos antimicrobianos.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2017

RESUMO

Isolados de *Escherichia coli* uropatogênica podem possuir fatores específicos de virulência como adesinas, proteases, toxinas, sistemas de captura de ferro e fatores protetores contra o sistema imunológico, proporcionando maior capacidade de adaptação a novos ambientes e colonização, tornando-se o principal agente etiológico das infecções do trato urinário. A relação entre a resistência aos antimicrobianos e a virulência em cepas de *E. coli*, tem sido documentada, sugerindo uma associação genética importante. O objetivo deste estudo foi comparar a frequência dos principais fatores de virulência em UPEC sensíveis e multirresistentes aos antimicrobianos. Foram estudadas 50 cepas de *E. coli* multirresistentes (UPEC MDR), 50 cepas UPEC sensíveis aos antimicrobianos (UPEC não-MDR) e 52 amostras de *E. coli* de microbiota de origem fecal. A pesquisa dos principais genes de virulência foi feita por reação em cadeia da polimerase. Foram investigados 15 genes de virulência, nas cepas UPEC MDR, os genes mais prevalentes foram: *iutA* (70,0%), *traT* (58,0%), *fyuA* (44,0%), *tsh* (42,0%) e *papC* (32,0%). Os genes de virulência mais prevalentes nas cepas UPEC não-MDR foram *traT* (68,0%), *fyuA* (68,0%), *kpsII* (58,0%), *hlyA* (58,0%), *iutA* (40,0%). Em cepas de *E. coli* comensais foram detectados os genes *cvaA* (55,8%), *fyuA* (48,08%) e *traT* (32,7%). Observou-se que as ilhas de patogenicidade estavam mais presentes na UPEC MDR, e que os isolados patogênicos pertenciam principalmente ao grupo filogenético B2, diferente das cepas comensais pertencentes aos grupos B1 e A. Os resultados dos testes fenotípicos mostraram maior capacidade de invasão (34%) nos isolados patogênicos em relação aos isolados comensais (8%) além disso UPEC MDR é um forte produtor de biofilme em comparação com UPEC não-MDR e *E. coli* comensal. Estudos que correlacionam resistência e virulência favorecem uma melhor compreensão da patogênese desses microrganismos. Por conseguinte, estes dados confirmam que as amostras de UPEC multiresistentes podem ser mais virulentas do que as cepas UPEC não-MDR e *E. coli* comensais, alertando para o perigo da disseminação destas cepas e reforçando a importância da caracterização da resistência e virulência da UPEC.

Palavras-chave: fatores de virulência (VFs); ilhas de patogenicidade; resistência aos antimicrobianos; biofilme bacteriano; invasão bacteriana.

ABSHANA, L. P. **Comparison of virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* sensitive and multiresistant to antimicrobials.** Dissertation (Master in Microbiology). Center of Biological Sciences. State University of Londrina. Londrina. 2017

ABSTRACT

Isolates of uropathogenic *Escherichia coli* may have specific virulence factors such as adhesins, proteases, toxins, iron capture systems and protective factors against the immune system, providing greater adaptability to new environments and colonization, becoming the main etiological agent of urinary tract infections. The relationship between antimicrobial resistance and virulence in *E. coli* strains has been documented, suggesting an important genetic association. The objective of this study was to compare the frequency of the main virulence factors in susceptible and multiresistant UPEC to antimicrobials. Fifty strains of multiresistant *E. coli* (UPEC MDR), 50 antimicrobial susceptible strains (UPEC non-MDR) and 52 *E. coli* samples of fecal microbiota were studied. The main virulence genes were investigated by polymerase chain reaction. The most prevalent genes were: *iutA* (70.0%), *traT* (58.0%), *fyuA* (44.0%), *tsh* (42.0%) and *PapC* (32.0%). The most prevalent virulence genes in the non-MDR UPEC strains were *traT* (68.0%), *fyuA* (68.0%), *kpsII* (58.0%), *hlyA* (58.0%), *iutA* (%). In *E. coli* strains the *cvaA* (55.8%), *fyuA* (48.08%) and *traT* (32.7%) genes were detected. It was observed that the pathogenicity islands were more present in the UPEC MDR, and that the pathogenic isolates belonged mainly to phylogenetic group B2, different from the commensal strains belonging to groups B1 and A. The results of the phenotypic tests showed a greater capacity of invasion (34%) in pathogenic isolates compared to commensal isolates (8%) in addition UPEC MDR is a strong producer of biofilm compared to UPEC non-MDR and *E. coli* commensal. Studies that correlate resistance and virulence favor a better understanding of the pathogenesis of these microorganisms. Therefore, these data confirm that multi-resistant UPEC samples may be more virulent than non-MDR UPE and *E. coli* commensal strains, alerting to the danger of dissemination of these strains and reinforcing the importance of the UPEC resistance and virulence characterization.

Key words: virulence factors (VFs); pathogenicity islands; multidrug resistance; phylogenetic classification; bacterial biofilm; bacterial invasion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Padrão de resistência dos isolados nos ensaios de sensibilidade de Kirby Bauer.....	51
Figura 2 – Distribuição de marcadores PAI em UPEC MDR, UPEC não MDR e <i>E. coli</i> comensal	54
Figura 3 – Formação de biofilmes em UPEC MDR, UPEC não MDR e <i>E. coli</i> comensal	56
Figura 5 – Porcentagem de invasão em UPEC MDR, UPEC não MDR e <i>E. coli</i> comensal	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais fatores de virulência de UPEC e seu papel na patogênese	18
Tabela 2 – Características moleculares e de virulência de PAIs..	26
Tabela 3 – Sequências de oligonucleotídeos e tamanho do fragmento amplificado (pb) para estudo dos fatores de virulência.....	47
Tabela 4 – Sequências de oligonucleotídeos e tamanho do fragmento amplificado (pb) para estudo dos genes de resistência.....	48
Tabela 5 – Sequências de oligonucleotídeos para detecção das ilhas de patogenicidade já descritas.	49
Tabela 6 – Resultados resistência antimicrobiana em UPEC MDR, UPEC não MDR e <i>E. coli</i> comensal	50
Tabela 7 – Frequência de genes de virulência, distribuição de marcadores PAI e grupos filogenéticos em UPEC MDR, UPEC não MDR e <i>E. coli</i> comensal..	53
Tabela 8 – Formação de biofilmes e taxa de invasão em UPEC MDR, UPEC não MDR e <i>E. coli</i> comensal.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	15
1.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> UROPATOGÊNICA	16
1.3	FATORES DE VIRULÊNCIA	17
1.3.1	Adesinas	18
1.3.2	Invasão bacteriana	20
1.3.3	Toxinas	21
1.3.4	Aquisição de ferro	22
1.3.5	Fatores de proteção contra o sistema imune e Protectinas	23
1.4	ILHAS DE PATOGENICIDADE.....	25
1.5	FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	26
1.6	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	27
1.7	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.	28
1.8	ASSOCIAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIA BACTERIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA	31
2	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	35
3	ARTIGO CIENTÍFICO.	42
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma causa importante de infecções de trato urinário (ITU), sendo responsável por 70-95% das ITUs na comunidade e aproximadamente 50% das ITUs nosocomiais, representando, riscos associados a morbidade e mortalidade, além elevados custos em saúde.

As ITU recorrentes são especialmente problemáticas em muitos indivíduos. Acredita-se que o reservatório primário da UPEC seja o trato intestinal humano e empregue diversos fatores de virulência para colonizar e infectar o trato urinário de forma ascendente.

Isolados de UPEC apresentam uma considerável diversidade do genoma e possuem uma ampla gama de fatores associados à virulência incluindo toxinas, adesinas, invasinas e sistemas de proteção contra o sistema imune. Estes fatores são frequentemente codificados por ilhas de patogenicidade ou por meio de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons ou integrons, que contribuem na disseminação dos genes de resistência aos antibióticos e genes de virulência. A presença de vários genes de virulência está relacionado à patogenicidade de UPEC, porém seus níveis de expressão podem variar entre isolados patogênicos e não patogênicos.

Vários estudos de vigilância realizados no mundo mostraram resistência crescente aos antibióticos de primeira linha, incluindo cefalosporinas, fluoroquinolonas e sulfametoxazol-trimetoprim. Um exemplo de mecanismo que leva o microrganismo a ser resistente a uma classe de antimicrobianos é a produção de enzimas, como beta-lactamases que atuam hidrolisando o anel beta-lactâmico de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Dentre as mais preocupantes devido à sua ação nos beta-lactâmicos mais potentes, estão a beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), beta-lactamase do tipo AmpC (mediadas por plasmídeos), e Carbapenemases como a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC). A incidência das cepas resistentes aos beta-lactâmicos nos últimos anos tem aumentado, o que leva a maior morbidade e mortalidade, aumento dos custos de cuidados com a saúde e limitações nas opções terapêuticas.

A importância dos agentes patogênicos multirresistentes tem aumentado nos últimos anos, particularmente devido à emergência global de cepas hiper-virulentas e resistentes aos antibióticos. Neste contexto, os isolados UPEC multirresistentes tornam o

tratamento difícil e está associado ao aumento dos custos com cuidados de saúde e a perdas econômicas significativas, tornando-se um problema grave para a saúde pública

Numerosas controvérsias existem sobre a associação genética entre o mecanismo de virulência e a resistência aos antimicrobianos, em relação aos patógenos multirresistentes. É frequentemente assumido que mais resistência aos antimicrobianos significa maior virulência, porém alguns estudos revelam que a resistência aos antibióticos está significativamente associada a perda de genes de virulência.

Com o intuito de compreender essa relação, neste trabalho foram comparados os principais fatores de virulência, a produção de biofilme e avaliação da capacidade de invasão utilizando células HEP-2 em *Escherichia coli* Uropatogênica sensível e multirresistente aos antimicrobianos.

REVISÃO DE LITERATURA.

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, da família Enterobacteriaceae, exibe uma considerável versatilidade fisiológica e metabólica, incluindo variantes comensais não patogênicas, que constituem parte da microbiota normal dos seres humanos e outros animais. Estes isolados são adaptados para conviver de forma pacífica com o hospedeiro e em condições normais não causam doença no trato intestinal (KÖHLER; DOBRINDT, 2011). No entanto, podem adquirir fatores de virulência específicos, conferindo uma maior capacidade de adaptação a novos nichos e permitindo causar um amplo espectro de infecções. Os fatores de virulência são codificados por elementos genéticos que quando mobilizados em diferentes cepas pode criar novas combinações de fatores de virulência, permitindo que *E. coli* cause infecções entéricas e extraintestinais em indivíduos saudáveis (KAPER et al., 2004). De fato, as pressões seletivas nos habitats de *E. coli* comensal podem promover a emergência de fatores de virulência e resistência a antibióticos (TENAILLON et al., 2010; DOBRINDT, 2011).

Existem diversas variantes patogênicas que causam infecções intestinais, conhecidas como *E. coli* diarreiogênica ou DEC, ou extraintestinais chamadas de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), que acometem seres humanos e outros animais (KAPER et al., 2004; KOHLER; DOBRINDT, 2011).

DEC pode ser classificada em diferentes patótipos, de acordo com os determinantes genéticos de virulência, síndromes clínicas, sorotipos O e H, aspectos epidemiológicos, mecanismos de patogenicidade e tipos de interação com as células epiteliais intestinais. Os principais patótipos são: *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* aderente invasiva (AIEC) associado com a doença de Crohn e finalmente *E. coli* Enteroagregativa que produz a toxina de Shiga (STEAEC) (CLEMENTS et al., 2012).

Os fatores de virulência afetam uma ampla variedade de processos celulares e desempenham um papel decisivo na patogênese dos diferentes patótipos de *E. coli* (KAPER et al., 2004; MORIEL et al., 2010).

E. coli patogênica extraintestinal (ExPEC), está associada a diversas doenças sistêmicas ou localizadas. Em humanos, ExPEC causa infecções do trato urinário, pneumonias, meningites, sepse, entre outras, (RUSSO; JOHNSON, 2000). ExPEC também causa doenças sistêmicas em aves (NAKAZATO et al., 2009) e infecções no trato urinário de cães e gatos. A denominação dos tipos de EXPEC reflete o sítio de isolamento desse microrganismo, dessa forma, os isolados de infecção urinária são chamados de *E. coli* uropatogênicas (UPEC), os de meningite de neonatos são conhecidos como *E. coli* associadas à meningite neonatal (MNEC), os de sepse *E. coli* associada a sepse (SePEC), isolados de aves com colibacilose são denominados de *E. coli* patogênica aviária (APEC). Dois novos subgrupos patogênicos têm sido descritos, *E. coli* patogênica mamária (MPEC) e *E. coli* patogênica endometrial (EnPEC) (KOHLEK; DOBRINDT, 2011).

1.2 *Escherichia coli* Uropatogênica

As infecções do trato urinário (ITUs) são as infecções mais frequentes nos seres humanos em todas as idades, sendo *Escherichia coli* responsável por 70-95% das ITUs na comunidade (LEE et al., 2016; FOXMAN, 2010). Nos Estados Unidos, as ITUs se associam com 1,7 milhões de visitas a urgências e 470.000 hospitalizações, com um custo estimado de 3,5 bilhões de dólares (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015). De acordo com Gonçalves e colaboradores (2016), há evidências preocupantes do potencial de disseminação de UPEC multirresistente entre a infecção urinária adquirida na comunidade no Brasil.

A incidência de ITU é cerca de quatro vezes maior em mulheres do que em homens e essa diferença é atribuída principalmente ao menor comprimento da uretra e a distância entre o ânus e abertura uretral em mulheres (MITTAL et al., 2015). Além disso a atividade sexual é o principal fator de risco relatado em pacientes com ITU não complicada. Em teoria uma de cada duas mulheres adultas será afetada por cistite durante a sua vida e há um risco de 25 % para o desenvolvimento de UTI recorrente no próximo ano (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

UPEC origina-se principalmente das fezes do propio hospedeiro. Após a colonização uretral, migra através do trato urinário para atingir a bexiga e os rins, onde a invasão tecidual resulta nas síndromes clínicas de cistite e pielonefrite, respectivamente. As proteínas expressas na superfície externa destes isolados asseguram a colonização bem sucedida do trato urinário através da ligação com as células epiteliais. Essas infecções se destacam além da frequência, pela possibilidade de evoluírem para casos graves, como lesão renal e sepse, acarretando em aumento de índices de morbidade e elevados custos ao sistema de saúde principalmente em países em desenvolvimento (DALE; WOODFORD, 2015).

UPEC utiliza numerosos fatores de virulência que permitem aderir, adquirir nutrientes, invadir e evadir do sistema imune do hospedeiro, causando-lhes injúrias teciduais e estimulando a resposta inflamatória (DALE; WOODFORD, 2015; ZHAO et al., 2009; SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

1.3 Fatores de virulência de UPEC

Os genes responsáveis pela codificação de fatores de virulência podem estar no cromossomo bacteriano, onde são usualmente localizados dentro de ilhas de patogenicidade (PAIs), ou em plasmídeos (JOHNSON; STELL, 2000^a, DALE; WOODFORD, 2015).

A virulência de UPEC parece resultar da combinação de vários fatores atuando em diferentes níveis de processos fisiopatológicos, sendo classificados em cinco categorias: adesinas que permitem aderir ao epitélio humano; invasinas e toxinas que promovem passagem no intestino, trato urinário e na corrente sanguínea; sistemas de captura de ferro e, finalmente, os fatores de proteção contra o sistema imunológico (Tabela 1). Por apresentarem estas características especiais, podem colonizar diferentes sítios extraintestinais, sobreviver em ambientes com baixa concentração de ferro, escapar do sistema imune do hospedeiro, resistir às células de defesa e à atividade lítica do soro, invadir tecidos, além de produzir substâncias citotóxicas como hemolisinas (RUSSO; JOHNSON, 2003).

As evidências atuais sugerem que um único fator de virulência não torna um isolado de UPEC capaz de causar doença específica. Sua patogenicidade está relacionada com a expressão de vários genes, conferindo um potencial incomum em amostras comensais (SABATÉ et al., 2006; DALE; WOODFORD, 2015). ExPEC possuem fatores

de virulência necessários para infecções extraintestinais, alguns desses são mais específicos a determinados grupos, como *tsh* e plasmídeo ColV em APEC, cápsula K1 de NMEC e *Sat* em UPEC. O que proporciona uma forte evidência de que certo arsenal genético é necessário para a aquisição e a expressão dos fatores de virulência (MELLATA, 2013).

Dale e Woodford (2015) pesquisaram genes codificadores de fatores de virulência em UPEC e demonstraram que *pap*, *traT* e *hly* foram mais prevalentes entre pacientes com pielonefrite. Embora essas associações devam ser interpretadas com cautela, fornecem evidências para apoiar a teoria de que os perfis destes fatores são susceptíveis de estarem associados com a propensão de UPEC a causar doença específica no trato urinário.

A regulação da expressão gênica também é um aspecto importante na manifestação da virulência das enterobactérias. Condições ambientais como temperatura, oferta de nutrientes e ferro são fundamentais para a expressão dos principais fatores de virulência (BIDET et al., 2012).

TABELA 1: Principais fatores de virulência identificados em UPEC e seu papel na patogênese.

ADESINAS	Receptor	Patogêneses
Fímbria P <i>papG-papC</i>	GbO4, GbO3 (Gal (α 1- 4 β)Gal)	Adesão a células Infecção urinaria, pielonefrite
Fímbria tipo1 <i>FimH</i>	D- Manose	Adesão a células Infecção urinaria, cistite e Meningite
<i>ecpA</i> Fímbria tipo S <i>sfaS</i>	Fímbria adesiva extracelular NeuNAc(α 2- 3)Gal	Adesão a células Infecção urinaria, meningite
INVASINAS	Receptor	Patogêneses
<i>IbeA</i>	Vimentine	Invasão das células endoteliais
TOXINAS	Modo de Ação	Patogênese
Hemolisina α <i>hlyA</i> <i>hlyF</i> <i>tsh</i>	Responsáveis pela produção de hemolisina hemaglutinina temperatura sensível	Lises de células renais, indução da secreção de IL6 e IL8.
<i>cnf1</i>	Ativação de GTPases Rho, Rearranjo do citoesqueleto	Resistência à fagocitoses, e invasão das células epiteliais. I.U recorrentes.

CAPTURA DE Ligante	Patogênese
Fe	
<i>iutA</i>	Receptores de sideróforo aerobactina- Fe+++
<i>iroN</i>	Receptores de Salmoquelina- Fe+++
<i>fyuA</i>	Receptor de yersiniabactina
PROTECTINAS	Modo de Ação
<i>Capsule K1</i>	Resistência ao complemento, fagocitoses e sobrevivência intracelular.
<i>traT</i>	Inibição da formação do complexo C5b6
<i>iss</i>	Resistência a o complemento
<i>cvaA</i>	Bacteriocina (Colicina V)
<i>ompT</i>	Resistência à protamine (peptídeo antibacteriano)
	Codifica a produção de proteína de membrana externa.

Fonte: BIDET et al., 2012; BÉLANGER et al., 2011; JOHNSON et al., 2008; SANTOS et al., 2009.

1.3.1 Adesinas

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

As fímbrias tipo 1 estão presentes em mais de 80% das cepas de *E. coli* além de outras espécies de enterobactérias. A subunidade protéica menor denominada FimH, liga-se especificamente aos resíduos de D-manose ligados à superfície de glicoproteínas da membrana que revestem as células vaginais, perineais, da bexiga e enterócitos e sua expressão está sob controle de um promotor localizado em um segmento de DNA de 314 pb, sendo responsável pela invasão bacteriana no tecido do hospedeiro, a FimA sem a expressão da subunidade FimH não possui capacidade de aderência. Estudos recentes demonstraram que determinadas variantes de FimH podem mediar contato interbacteriano, estimulando a formação de biofilme, o que confere maior resistência

bacteriana às defesas do hospedeiro e também contra a ação de determinados antimicrobianos (BIDET et al., 2012; SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

A fímbria tipo P é codificada pelo operon *pap* (*pyelonepritis associated adhesin*), que compreende os genes: *papA* que codifica a subunidade maior do corpo da fímbria; *papE*, *papF* e *papG* que codificam as subunidades menores; *papH* que ajuda na fixação na célula; *papC* e *papD* que são responsáveis pela polimerização e transporte dos peptídeos da fímbria (BIDET et al., 2012). Essa adesina reconhece glicopeptídeos que contêm especificamente o dissacarídeo α -D-galactose (1-4) β -D-galactose, envolvido em diferentes infecções extraintestinais (RUIZ et al., 2002). Foi inicialmente encontrada em amostras de *E. coli* que causam ITUs em humanos, e sendo responsável pela aderência bacteriana às células uroepiteliais, e está envolvida no desenvolvimento de pielonefrite (LE BOUGUENEC, 2005).

A fímbria *E. coli* pilus comum (ECP), é uma adesina extracelular codificada pelo operon *ecpRABCDE*. Foi descrita em associação com meningite neonatal e sepses (SALDAÑA et al., 2009). Novos estudos, no entanto, revelaram que o operon do *ecp* é bastante conservado e distribuído em *E. coli*, tornando-o uma estrutura comum tanto em amostras comensais como em amostras patogênicas. Além disso, esse gene é encontrado em outras enterobactérias patogênicas que se desenvolvem no trato gastrointestinal e urinário (GARNETT et al., 2012)

1.3.2 Invasão Bacteriana

O gene *ibeA*, codifica uma invasina com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, ligando-se a um receptor específico presente na superfície das células endoteliais do cérebro humano, identificado como vimentina (BIDET et al., 2012). Descrita inicialmente em um isolado de *E. coli* associada a meningite em recém-nascidos (NMEC) contribuindo para sua patologia. O gene da proteína de invasão IbeA está localizado numa ilha genômica, *GimA*, que codifica uma proteína com papel importante na invasão de ExPEC (DERAKHSHANDEH et al., 2015).

1.3.3 Toxinas

As toxinas são constituídas por diferentes proteínas, capazes de induzir alterações na forma ou função das células hospedeiras (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

Isolados hemolíticos predominam em infecções extraintestinais, tais como ITU, peritonite, apendicite, sepses e meningite neonatal. A α -hemolisina (gene *hly*), conhecida também como proteína formadora de poros na membrana de células eucarióticas, possui capacidade de lisar eritrócitos, leucócitos, fibroblastos e células uroepiteliais. A lise de eritrócitos aumenta a disponibilidade do íon ferro para o microrganismo, e ocorre frente a altas concentrações da α -hemolisina. Essa proteína, em baixas concentrações, é lítica para leucócitos, monócitos e linfócitos T periféricos. A síntese, a maturação e a secreção da α -hemolisina são determinadas pelo operon *hlyCABD*, que codifica as proteínas HlyA, HlyB, HlyC e HlyD, as quais estão envolvidas na lise das células (ISLAND et al., 1998; (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

O gene *hlyA* tem sido frequentemente associado ao grupo filogenético B2 de amostras de UPEC. Trabalhos como os de Zhao e colaboradores (2009) mostraram uma frequência de 34%, relacionadas a esse grupo filogenético.

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

A hemaglutinina Tsh, codificada pelo gene *tsh*, foi isolada e caracterizada pela primeira vez em amostra de APEC que causavam aerossaculite e colisepticemia em aves (DOZOIS et al., 2000). Apresenta atividade mucinolítica em adição à atividade de hemaglutinação. No entanto, seu papel em ExPEC tem sido questionado por alguns autores, que comparam os fatores de virulência presentes em microbiota fecal e UPEC, e encontraram o gene *tsh* em 63% de UPEC e em 33% de *E. coli* isolada de fezes. Esses dados sugerem que o gene *tsh* faz parte do conjunto de genes de virulência presentes em UPEC (HEIMER et al., 2004).

A toxina SAT é codificada por um único gene (*sat*). Essa toxina favorece a passagem da bactéria a partir da barreira glomerular permitindo que atinja a circulação sanguínea do hospedeiro. Foi demonstrada na cepa uropatogênica CFT073, uma amostra

protótipo de UPEC, isolada de sangue e urina de uma paciente com pielonefrite (BIDET et al., 2012).

O Fator Necrosante Citotóxico 1 (CNF1) é uma toxina caracterizada por impedir a divisão celular, pertence à família de toxinas que ativam GTPase através da desaminação da glutamina 63 e 61, sua ativação induz a formação de fibras de estresse e adesão focal (RhoA) o que leva a um rearranjo do citoesqueleto, sendo o fator Rho controle essencial na adesão, mobilidade e morfologia celular. Estudos demonstram que essa toxina era citotóxica para células da linhagem HeLa (carcinoma uterino), pois causa multinucleação em linhagens celulares e necrose em pele de coelho (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

O envolvimento de CNF1 na patologia humana é sugerido pela sua elevada prevalência em amostras isoladas de infecções urinárias, incluindo prostatite (60-70%) em relação à sua baixa prevalência em isolados fecais (<10%) (BIDET et al., 2012).

1.3.4 Aquisição de ferro

A concentração de ferro é limitada em locais de infecção extraintestinal pois não é um nutriente disponível livremente, e fatores do hospedeiro, como proteínas quelantes de ferro reduzem a sua disponibilidade. O ferro é elemento essencial para a bactéria por interferir com numerosas funções metabólicas como transporte de oxigênio e transporte de elétrons (BIDET et al., 2012).

A aquisição de ferro é uma necessidade crítica de patógenos que se multiplicam dentro de um hospedeiro (ANDREWS et al., 2003; RUSSO et al., 2002). As bactérias patogênicas desenvolvem diversos mecanismos envolvidos na aquisição de ferro para superar seu déficit, como a síntese de sideróforos, que são quelantes de ferro de sistemas de captação de ferro de moléculas, como: grupo heme, transferrina e lactoferrina (ANDREWS et al., 2003). A perda desses sistemas em bactérias patogênicas diminui acentuadamente sua virulência demonstrando a correlação entre aquisição de ferro e doenças infecciosas bacterianas. Fatores que envolvem a aquisição de ferro possuem uma alta prevalência em isolados de UPEC (BÉLANGER et al., 2011).

A salmoquelina e a aerobactina são siderofóros produzidos em condições de baixa disponibilidade de ferro nos fluidos corpóreos e nos tecidos de vertebrados e tem

como função capturar ferro da transferrina (CAZA et al., 2011). Os genes que codificam a aerobactina podem estar localizados, tanto no cromossomo bacteriano, como em plasmídeos. Este operon, *iucABCD*, é composto por quatro genes que codificam enzimas necessárias para a síntese da aerobactina e um gene *iutA*, receptor de aerobactina. Esse siderofóro é encontrado facilmente em isolados de pacientes com pielonefrite (73%), cistite (49%) ou bacteremia (58%) e, também podem ser encontradas, em pacientes com bacteriúria assintomática (38%) ou em amostras fecais (41%), mostrando a maior participação desse fator de virulência nas infecções extraintestinais, principalmente no trato urinário (CAZA et al., 2011).

A salmoquelina, internalizada através do receptor *iroN*, é a forma glicosilada da enterobactina, se encontra codificada pelos genes *iroBCDEN* e localiza-se no plasmídeo ColV ou ColBM. Utiliza o mesmo sistema de transporte ABC da enterobactina, FepCDG, e sua presença tem sido associada à virulência de UPEC, NMEC e APEC (CAZA et al., 2011).

Além desses fatores de virulência, também pode ser encontrado a yersiniabactina, relacionada com a captação de ferro, e originalmente observado em *Yersinia* spp (JOHNSON; RUSSO, 2006)

1.3.5 Fatores de proteção contra o sistema imune e Protectinas

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

A cápsula do tipo II, codificada pelo gene *kps*, pode ser compreendida como um envelope formado por polissacarídeos de alto peso molecular e que são fortemente ancoradas à célula. É responsável por conferir patogenicidade à espécie, além de conferir resistência à atividade imunológica inata, como fagocitose e ação do sistema complemento (JOHNSON; O'BRYAN, 2004; JOHNSON; STELL, 2000).

O gene *iss* foi descrito em *E. coli* isolada de humanos, associado com o plasmídeo conjugativo (ColV). Esse gene é responsável por conferir resistência sérica, pelo bloqueio do complexo terminal do sistema complemento que atua na membrana

celular causando a lise da célula bacteriana. Portanto, ele confere à bactéria resistência ao complemento, que é um mecanismo de defesa do hospedeiro e que atua contra infecções. Essa característica é importante para a patogênese uma vez que auxilia a bactéria a persistir nos fluidos e órgãos do hospedeiro (MELLATA et al., 2003).

A endoprotease ompT ajuda na permanência de *E. coli* no trato urinário, prolongando a infecção (VANDEPUTTE-RUTTEN et al., 2001). Essa proteína localizada na membrana externa, tem sido caracterizada como um ativador do plasminogênio, com a capacidade de hidrolisar a protamina e bloquear a sua entrada. Em um trabalho realizado por ZHAO e Colaboradores (2009), foi encontrado mais de 60% de positividade do gene *ompT* nas amostras de UPEC (VANDEPUTTE- RUTTEN et al., 2001).

Colicinas, são proteínas expressas por *E. coli* que inibem o crescimento bacteriano da mesma espécie ou de espécies afins, uma estratégia eficaz num ambiente estruturado o que poderia permitir que isolados inadaptados colonizassem o intestino e, portanto, permitisse que vários clones coexistissem promovendo a diversificação (TENAILLON et al., 2010). Compostas por duas subunidades: uma que provoca lesões de células bacterianas e outra que protege a bactéria contra suas próprias colicinas, podem ser codificadas por genes localizados em plasmídeos (Col) (NAKAZATO et al., 2009).

O plasmídeo ColV, varia em tamanho desde 80 até 180 kb, codificam a produção de colicina V, proteína que interrompe a formação do potencial de membrana para a produção de energia e favorecendo a resistência sérica, (BECEIRO et al., 2013). Outras características relacionadas com o plasmídeos ColV incluem os genes *iss*, *IutA* e *tsh*, relacionados com a patogenicidade (JOHNSON et al., 2006).

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

1.4 Ilhas de patogenicidade (PAI)

A patogenicidade de UPEC é devida à presença de genes de virulência localizados em cromossomas ou plasmídeos que são pouco frequentes entre os isolados de *E. coli* comensais, por eles diferirem em relação aos grupos filogenéticos e aos atributos de virulência (SABATÉ et al., 2006). Esses genes de virulência no cromossomo são tipicamente encontrados em regiões específicas chamadas ilhas de patogenicidade (PAI) (SAMEI et al., 2016).

PAIs são segmentos de DNA inseridos no cromossomo bacteriano, com propriedades diferentes do restante do genoma bacteriano, e podem ser identificadas por características tais como o tamanho (>10 kb) ou sequência genética. Algumas PAIs são regiões instáveis e podem desaparecer espontaneamente do cromossomo (SAMEI et al., 2016). Considera-se que evoluíram a partir de elementos genéticos móveis por transferência horizontal de genes, pode-se também supor que essas regiões de DNA sofreram e continuarão a sofrer mudanças evolutivas adicionais, resultando em uma evolução contínua de patógenos bacterianos. A identificação de PAIs é essencial para a compreensão do desenvolvimento da doença e da evolução da patogênese bacteriana (SAMEI et al., 2016).

Os elementos genéticos codificam vários fatores de virulência tais como sistemas de secreção de proteínas, fatores de invasão do hospedeiro, sistemas de absorção de ferro e toxinas (KOGA et al., 2014; SABATÉ et al., 2006). Sendo os principais fatores encontrados em UPEC, os que conferem adesão, como fímbria tipo 1 (*fimH*), fímbria P (*PapC* e *PapG*); resistência à atividade lítica do soro (*iss* e *ompT*); capacidade de multiplicação em ambientes pobres em ferro devido à presença de sideróforo (*iutA*, *iroN*); capacidade de causar lesão tecidual pela hemolisina (*hly*), entre outros fatores (Tabela 2) (KOGA et al., 2014)

Tabela 2. Características moleculares e de virulência de PAIs de patógenos bacterianos causadores de doenças em humanos e animais.

PAI	Determinantes de Virulência
PAI I ₅₃₆	α -hemolisina, fímbrias CS12 e adesina fímbrial semelhante a F17

PAI II ₅₃₆	α -hemolisina, fímbrias relacionadas ao P, aderência semelhante à hemaglutinina, aderência Hek, fímbrias P, proteínas reguladas pelo ferro
PAI III ₅₃₆	Fímbria S, salmoquelina, receptor de heme tipo HmuR, toxina de Sat, protease de hemoglobina de tipo Tsh, antigénio 43
PAI IV ₅₃₆	Sistema de sideróforo de Yersiniabactina
PAI I _{J96}	α -hemolisina e fímbria P
PAI II _{J96}	α -hemolisina, fímbria Prb, Factor Necrotizante Citotóxico
PAI I _{CFT073}	α -hemolisina, fímbria P e aerobactina
PAI II _{CFT073}	Fímbria P e genes regulados pelo ferro

Fonte: SABATÉ et al., 2006; SAMEI et al., 2016.

1.5 Formação de Biofilme

A formação de biofilme é o resultado das interações bacterianas com uma superfície que promove novos comportamentos de células planctônicas, levando ao desenvolvimento de comunidades bacterianas estruturadas e heterogêneas o que facilita a transmissão horizontal de genes, devido à elevada densidade microbiana das populações (BECEIRO et al., 2013).

As bactérias do biofilme apresentam um comportamento coordenado com a formação de estruturas tridimensionais complexas e comunidades bacterianas funcionalmente heterogêneas com diferenças na expressão de moléculas de superfície, resistência antimicrobiana, utilização de nutrientes e fatores de virulência (EJRNAES, 2011). As infecções por biofilme são importantes porque se caracterizam pelo aumento da tolerância ao estresse, aos antimicrobianos e às defesas imunológicas do hospedeiro (PONNUSAMY et al., 2012).

Os fatores de virulência contribuem e tornam o microrganismo capaz de resistir a mecanismos de defesa imune do hospedeiro, resultando na persistência do microrganismos no tecido hospedeiro. Essa propriedade pode ser um contribuinte na formação do biofilme, o que permite a colonização da mucosa da bexiga. No trato urinário, o biofilme bacteriano está envolvido com ITU persistentes e recorrentes, dificultando o tratamento com o uso de antibióticos e protegendo-o de moléculas tóxicas, tais como agentes antimicrobianos naturais, radicais hidroxila e ânions superóxido (MITTAL et al., 2015).

Os flagelos demonstraram contribuir para a fase inicial de aproximação à superfície, embora estudos tenham mostrado que não é um requisito absoluto. No passo adicional de formação de biofilme, a ligação de bactérias à superfície mostrou incluir um certo número de fímbrias incluindo fímbrias de tipo 1 e pili conjugativo, envolvidas na maturação do biofilme (EJRNAES, 2011).

1.6 Classificação filogenética

De acordo com a classificação filogenética, as cepas de *E. coli* podem ser parte de sete principais grupos (A, B1, B2, C, D, E e F). Esta agrupação se dá pela presença ou ausência dos genes *chuA*, *yjaA*, *arpA* e o fragmento de DNA TSPE4.C2 (CLERMONT et al., 2013).

Amostras comensais, em sua grande maioria, pertencem aos grupos filogenéticos A e B1 (KUMAR et al., 2016; TENAILLON et al., 2010); enquanto amostras patogênicas intestinais agrupam-se igualmente em A, B1 e D. Diferentemente, destas, as amostras patogênicas extraintestinais são, em sua maioria, oriundas dos grupos filogenéticos B2, e com menor frequência ao grupo D (KUMAR et al., 2016).

O estudo dos grupos filogenéticos é de particular interesse, uma vez que existe uma relação entre o fundo genético e seus fatores de virulência. Por exemplo, alguns tipos de sequência (STs) dentro do filogrupo B2, tais como ST137, incluem isolados com numerosos genes extraintestinais e elevado potencial de virulência (CYOIA et al., 2015).

A doença extraintestinal causada pela presença ou ausência de uma ampla gama de genes, varia entre as cepas de diferentes grupos filogenéticos (KUMAR et al., 2016). Porém ao longo da última década, vários autores têm realizado estudos de rastreamento microbiológico, demonstrando que 11 a 48% de indivíduos saudáveis são colonizados com *E. coli* pertencente ao filogrupo B2, tradicionalmente associado a virulência e infecções por UPEC.

A variação observada na prevalência de cepas pertencentes ao grupo B2 é multifatorial e provavelmente representa diferenças em fatores geográficos, embora seja claro que a colonização com isolados de *E. coli* do filogrupo B2 é comum, o que é menos claro é o potencial de virulência associado dos isolados, transportados por indivíduos assintomáticos e determinados pela análise do perfil de virulência (DALE; WOODFORD, 2015).

E. coli comensal, que não possuem fatores de virulência associados a UPEC, hipoteticamente pertencentes a qualquer filogrupo, podem tornar-se organismos

potencialmente virulentos como resultado da transferência horizontal de genes de outras enterobactérias. Essas habilidades contribuem para uma ecologia dinâmica e têm o potencial de resultar na distribuição generalizada de cepas patogênicas entre uma ampla população (DALE; WOODFORD, 2015).

1.7 Resistência aos antimicrobianos

A resistência antimicrobiana é reconhecida como um dos problemas mais importantes de saúde pública do mundo. As consequências da resistência aos antimicrobianos representam uma ameaça crescente para a sociedade (DA SILVA; MENDONÇA, 2012).

Quando infecções muitas vezes não conseguem responder aos tratamentos padrão, resultando em doenças prolongadas, aumenta as probabilidades dos microrganismos resistentes se disseminar, além disso os custos associados ao tempo de hospitalização e a utilização de antibióticos de última geração são incrementados significativamente (BLAIR et al., 2015; DA SILVA; MENDONÇA, 2012).

A resistência aos antimicrobianos em bactérias é uma característica codificada geneticamente, sendo de origem intrínseca, quando se associa aos genes cromossomais ou adquirida quando envolve mudanças na composição genética do microrganismo, seja por mutação ou aquisição de genes que conferem resistência e ocorre por meio de elementos genéticos moveis como plasmídeos, transposons ou integrons, que contribuem na disseminação dos genes de resistência aos antibióticos e genes de virulência (AL-BAYSSARI et al., 2015).

Essa resistência se deve a diversos mecanismos, que se dividem em três grupos principais: primeiro, os que minimizam as concentrações intracelulares do antibiótico como resultado de uma baixa penetração na bactéria ou de efluxo ao antibiótico no caso as bombas de efluxo que exportam substratos do periplasma para o meio externo; segundo, aqueles que modificam o alvo do antibiótico por mutação genética ou modificação do alvo, por exemplo a modificação do sítio alvo das PBPs, e terceiro, aqueles que inativam o antibiótico por hidrólise enzimática ou modificação (BLAIR et al., 2015; DRAWZ; BONONO, 2010).

A presença de plasmídeos que carregam muitos genes de resistência tornam o microrganismo multirresistente. A multirresistência (MDR) é definida como a resistência

a três ou mais classes de antimicrobianos (IBRAHIM et al., 2012). O aumento da prevalência de MDR em pacientes com ITU em hospitais e na comunidade, e sua resistência aos antibióticos comumente usados devido à produção de beta-lactamase é preocupante. No entanto, as novas famílias de agentes antimicrobianos têm uma curta expectativa de vida (IBRAHIM et al., 2012; MITTAL et al., 2015).

Penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos representam a classe mais utilizada de antibióticos em tratamento de infecções graves causadas por *E. coli* na comunidade ou por infecções hospitalares (LIVERMORE; WOODFORD, 2006), possuem como característica em comum uma estrutura chamada anel beta-lactâmico (BROLUND; SANDEGREN, 2015). Esses antibióticos são bactericidas e seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese da parede celular e indução da autólise bacteriana. Atuam inibindo a ação das transpeptidases ou proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), interferindo na síntese do peptidoglicano, o que resulta em lise osmótica e morte celular (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Um exemplo de mecanismos que leva o microrganismo a ser resistente a uma classe de antimicrobianos é a produção de enzimas, como beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), beta-lactamase AmpC e Carbapenemases (AL-BAYSSARI et al., 2015;). A incidência das cepas resistentes aos beta-lactâmicos nos últimos anos tem aumentado, o que leva a maior morbidade e mortalidade, aumento dos custos de cuidados com a saúde e limitações nas opções terapêuticas (SILVA; LINCOPAN, 2012).

As ESBL derivam de mutações pontuais em genes que codificam as beta-lactamases clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV-1, ampliando sua capacidade em hidrolisar o anel beta-lactâmico de mais grupos de penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro de ação (terceira geração) como a ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxone e aos monobactâmicos como o aztreonam, mas não apresentam atividade contra carbapenêmicos, cuja ação hidrolítica é geralmente bloqueada *in vitro* por inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, tazobactam, sulbactam) (AL-BAYSSARI et al., 2015).

Essas enzimas são encontradas principalmente nas enterobactérias, sendo *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* os principais produtores (AL-BAYSSARI et al., 2015).

As beta-lactamases de espectro estendido do tipo CTX-M, são cada vez mais prevalentes entre *E. coli* e *Klebsiella spp.* Foram descritas e divididas em cinco grupos filogenéticos. Nos últimos anos apresentou-se uma disseminação de forma acelerada nos cinco continentes das enzimas da família CTX-M, sendo mais predominantes na América do Sul, no Brasil foi identificada pela primeira vez na década de 1990. De acordo com a família CTX-M, as beta-lactamases mais frequentes isoladas no Brasil incluem os grupos CTX-M-2, CTX-M-8, e CTX-M-9 (SILVA; LINCOPAN, 2012; WOODFORD et al., 2005).

Carbapenemases representam o mecanismo mais forte de resistência a carbapenêmicos e pertencem a classe de A, B e D de Ambler. As principais carbapenemases de Classe A são KPC e a NDM, apresentando ampla disseminação por serem codificados cromossômicamente ou mediada por plasmídeos (AL-BAYSSARI et al., 2015).

Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC) são carbapenemases que hidrolisam todos os antibióticos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (BUSH; JACOBY, 2010). São enzimas facilmente adquiridas e disseminadas entre espécies de enterobactérias, por terem seus genes carregados em plasmídeos, transposons e integrons. Até hoje, 24 variantes de KPC (KPC-1- KPC-24) (LAHEY, 2016), têm sido encontrados em vários gêneros, tais como, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter spp*, *Salmonella. spp*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Geralmente, devido à sua expressão mediada por plasmídeo, também produzem outras beta-lactamases, incluindo ESBL (TEM, SHV e CTX-M) (AL-BAYSSARI et al., 2015).

1.8 Associação entre resistência bacteriana e fatores de virulência

O uso de antibióticos é considerado um fator importante associado ao aumento da frequência de resistência aos antimicrobianos entre os patógenos. Estudos sobre os mecanismos moleculares sugerem associação genética, demonstrando a existência de relações positivas e negativas entre a resistência aos antibióticos e virulência em cepas de *E. coli* (ZHANG et al., 2015).

A pressão de seleção e os mecanismos genéticos contribuem para a correlação positiva entre virulência e resistência aos antimicrobianos. O uso de antibióticos está associado ao aumento da resistência dos microrganismos. Portanto, as cepas com grande patogenicidade, têm maior probabilidade de serem expostas à terapia com antibióticos do que as cepas não patogênicas e têm maior probabilidade de desenvolver resistência (ZHANG et al., 2015).

O uso de antibióticos para tratar infecções também pode afetar o desenvolvimento de resistência em cepas comensais dos hospedeiros, e ocorre quando a bactéria sofre alterações genéticas que interferem no mecanismo de ação do antibiótico (LIVERMORE, 2003). Reduzir o uso de antibióticos e, portanto, reduzir a pressão de seleção, é considerada uma estratégia importante para controlar os níveis de resistência (ZHANG et al., 2015).

As cepas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) tornaram-se um grande desafio, uma vez que drasticamente reduzem as escolhas terapêuticas (SILVA; LINCOPAN, 2012). Este problema torna-se mais grave frente à bactérias potencialmente patogênicas, que contêm fatores de virulência especializados, tais como adesinas, toxinas, adesinas, sideróforos, cápsulas, hemolisinas e invasivas; os quais ajudam ao microrganismo a evitar ou subverter as defesas do hospedeiro, para colonizar regiões anatômicas e/ou iniciar uma resposta inflamatória do hospedeiro causando infecções (DALE; WOODFORD, 2015).

Como exemplo, podemos citar *E. coli* ST131, produtora de CTX-M15 e portadora de elevados níveis de genes associados à virulência (BLAIR et al., 2015). O isolado foi relatado pela primeira vez em 2008, em ambiente hospitalar, e agora é considerado um clone pandêmico, por estar presente em diferentes países, é um patógeno de importância global, estando presente em isolados clínicos hospitalares, animais e alimentos (DALE; WOODFORD, 2015).

Hussain e colaboradores (2012), demonstraram que um grupo de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL, além de ser resistente à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos, é frequentemente resistente aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, representando uma ameaça significativa para a saúde humana, uma vez que implica graves desafios terapêuticos. Foi demonstrado que existe uma grande propensão de transmissão de clones multirresistentes de humanos para animais e vice-versa (DA SILVA; MENDONÇA, 2012).

Hospedeiros e bactérias têm co-evoluído ao longo de milhões de anos, durante o qual as bactérias patogênicas têm modificado sua virulência para se adaptar aos sistemas de defesa do hospedeiro, o que contrasta com a recente evolução da resistência aos antibióticos (BECEIRO et al., 2013).

A virulência e resistência têm evoluído, mas compartilham algumas características comuns, do ponto de vista biológico, ambos processos são necessários para a sobrevivência das bactérias, porém os mecanismos de virulência são necessários para superar sistemas de defesa, e o desenvolvimento da resistência antimicrobiana é essencial para permitir que as bactérias patogênicas possam se adaptar e sobreviver em ambientes competitivos e exigentes (BECEIRO et al., 2013).

A associação entre resistência e virulência não é claro, porém no manejo clínico de doenças infecciosas, em relação aos patógenos multirresistentes, é frequentemente assumido que mais resistência aos antimicrobianos significa maior virulência, o que pode não ser verdade. No entanto, a ligação entre a resistência e virulência depende das interações entre a base filogenética do isolado e o tipo de determinante de resistência (BECEIRO et al., 2013).

Globalmente, estudos revelam que a resistência aos antibióticos está significativamente associada à ausência de genes de virulência, alguns dados sugerem que entre os isolados de *E. coli* de pacientes com urosepses, a resistência a agentes antimicrobianos, tais como ampicilina, sulfonamidas, tetraciclina e estreptomicina, está negativamente associada à virulência (SUKUMARAN; HATHA, 2015). Isso tem sido interpretado como perda de fatores de virulência concomitante com a mutação à resistência. No entanto, esta hipótese não leva em conta os deslocamentos filogenéticos (fora do grupo B2) observados entre os isolados resistentes, o que sugere que estes derivam principalmente de populações bacterianas distintas e menos virulentas (BECEIRO et al., 2013; EJRNAES, 2011).

Soto e colaboradores (2006) concluíram que a multirresistência está associada, negativamente, eles sugerem que em cepas de UPEC ocorria uma perda de ilhas de patogenicidade induzida por resistência a Quinolonas o que levou a diminuição do conteúdo de genes de virulência (EJRNAES, 2011). Esta redução também foi relatada para cepas resistentes a trimetoprim/sulfamexazole (MORENO et al., 2006), um exemplo típico de como a aquisição de resistência a um antibiótico específico, está relacionado com uma diminuição da virulência.

Dubois e colaboradores (2009) relataram o isolamento, a partir de um paciente com meningite neonatal, de uma cepa de *E. coli* com três plasmídeos diferentes, um dos quais codificava a beta-lactamase do tipo CTX-M1. Observou-se que o plasmídeo que codificava para esta enzima não aumentava a incidência de meningite em um modelo murino, sugerindo, assim, que não aumenta a virulência de *E. coli* no modelo animal.

Por outro lado, um estudo sobre os mecanismos moleculares sugerem uma associação genética positiva, pela presença de plasmídeos que favorecem a expressão simultânea de fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos (ZHANG et al., 2015).

De acordo com a associação entre fatores de virulência e susceptibilidade antimicrobiana, verificou-se que *E. coli* susceptível a trimetropin-sulfametazol, tetraciclina ou a todos os antimicrobianos testados tinham uma capacidade de formar biofilme significativamente maior do que aqueles resistentes. Isso concorda com um estudo recente que demonstra que *E. coli* formador de biofilme são menos resistentes ao ácido nalidíxico do que aqueles sem capacidade de formação de biofilme (EJRNAES, 2011).

Não está bem elucidado se a expressão de beta-lactamases favorece a aquisição de genes de virulência no microrganismo. Beceiro e colaboradores (2013), não conseguiram estabelecer se a presença de um gene beta-lactamase, prejudica a expressão de genes de virulência de *E. coli* ST131, na colonização e invasividade nas células do hospedeiro.

Por sua vez Lavigne e colaboradores (2012) desenvolveram dois modelos de infecção in vivo previamente utilizados para caracterizar a virulência de *E. coli* produtor de beta-lactamase do tipo CTX-M-15 (ST131) e não produtores (não ST131). *E. coli* ST131 que aloja o gene *bla*_{CTX-M-15} não parece ser um patógeno virulento, tem se descrito que existem cepas com diferentes níveis de virulência neste clone. No entanto, pode causar uma infecção persistente, isto indica que o segredo do sucesso é conseguir um equilíbrio perfeito entre a virulência e a resistência.

Com o intuito de compreender essa relação, neste trabalho foram comparados os principais fatores de virulência, a produção de biofilme e avaliação da capacidade de

invasão utilizando células HEp-2 em *Escherichia coli* Uropatogênica sensível e multirresistente aos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BAYSSARI, C., DABBOUSSI F, HAMZE M, ROLAIN JM. (2015). **Detection of expanded spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century.** Expert Rev. Anti Infect. Ther. Early online, 1–20.

ANDREWS, S. C., ROBINSON, A. K., RODRIGUEZ-QUINONES, F. (2003). **Bacterial iron homeostasis.** *Fems Microbiol Rev.* **27**, 215-237.

BECEIRO, A; TOMÁS, M; BOU, G. (2013). **Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?.** Clinical Microbiology Reviews April Vln 26 Number 2.

BÉLANGER, B.; GARENAUX, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C. M (2011). **Escherichia coli from Animal Reservoirs as a Potential Source of Human Extraintestinal Pathogenic E. coli .** *Fems Immunol. Med. Microbiol.* **62**, 1-10.

BIDET, P., BONACORSI, S., BINGEN, E. (2012) **Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des Escherichia coli extra- intestinaux.** Archives de Pédiatrie, v.19, p.S80-S92.

BLAIR, JMA; WEBBER, MA; BAYLAY, AJ; OGBOLU, DO; PIDDOCK, LJV (2015). **Molecular mechanisms of antibiotic resistance.** Nat Rev Microbiol 13:42–51

BROLUND, A; SANDEGREN, L. (2015) **Characterization of ESBL disseminating plasmids.** Infectious Diseases. 1-8.

BUSH, K; JACOBY G. A. (2010). **MINIREVIEW Updated Functional Classification of β -Lactamases.** Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Mar. p. 969–976 Vol. 54, No. 3.

CAZA, M., LÉPINE, F., DOZOIS, C. M (2011). **Secretion, But Not Overall Synthesis, Of Catecholate Siderophores Contributes To Virulence Of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli.** *Mol. Microbiol.* **80**, 266-282.

P. S. CYOIA, G. R. RODRIGUES, E. K. NISHIO. (2015). **Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolates from Brazil.** J Infect Dev Ctries; 9(10):1068-1075.

CLEMENTS, A., YOUNG, JC, CONSTANTINOU, N., & FRANKEL, G. (2012). **Estratégias de infecção de Escherichia coli patogênica entérica.** *Gut Microbios* , 3 (2), 71-87. [Http://doi.org/10.4161/gmic.19182](http://doi.org/10.4161/gmic.19182)

CLERMONT, O., CHRISTENSON, J.K., DENAMUR, E., GORDON, D.M (2013). **The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.** Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.

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

DRAWZ, S. M; BONOMO, R.A. (2010). **Three Decades of β -Lactamase Inhibitors.** *Clinical microbiology reviews*, Vol. 23, No. 1. p. 160–201

DERAKHSHANDEH A, FIROUZI R, MOTAMEDIFAR M, MOTAMEDI BOROJENI A, BAHADORI M, ARABSHAHI S, NOVINROOZ A, HEIDARI S. (2015). **Distribution of virulence genes and multiple drug resistant patterns among different phylogenetic groups of Uropathogenic *E. coli* isolated from patients with urinary tract infection.** *Jpn. J. Infect. Dis.*, 68, 428–431.

DUBOIS D, PRASADARAO NV, MITTAL R, BRET L, ROUJOU-GRIS M, BONNET R.(2009) .**CTX-M beta-lactamase production and virulence of *Escherichia coli* K1.** *Emerg. Infect. Dis.* 15:1988–1990.

EJRNAES K, STEGGER M, REISNER A, FERRY S, MONSEN T, ET AL. (2011) **Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation.** *Virulence* 2: 528–537.

EWERS, C., LI, G., WILKING, H., KIEBLING, S., ALT, K., ANTÁO, E. M., BÖHNKE, U. (2007). **Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?.** *International Journal of Medical Microbiology*, 297(3), 163-176.

FOXMAN, B. (2010). **The epidemiology of urinary tract infection.** *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653-660.

GARNETT, J. A., MARTÍNEZ-SANTOS, V. I., SALDAÑA, Z., PAPE, T.; HAWTHORNE, W.; CHAN, J.; SIMPSON, P. J.; COTA, E.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A.; MATTHEWS, S. (2012). **Structural Insights Into The Biogenesis And Biofilm Formation By The *Escherichia coli* Common Pilus.** *Pnas.* 109, 3950–3955.

GONÇALVES, L. F., DE OLIVEIRA MARTINS-JÚNIOR, P., DE MELO, A. B. F., DA SILVA, R. C. R. M., DE PAULO MARTINS, V., PITONDO-SILVA, A., DE CAMPOS, T. A. (2016). **Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil.** *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 6, 1-4

HUSSAIN, A., EWERS, C., NANDANWAR, N., GUENTHER, S., JADHAV, S., WIELER, L. H., & AHMED, N. (2012). **Multiresistant Uropathogenic *Escherichia***

coli from a Region in India Where Urinary Tract Infections Are Endemic: Genotypic and Phenotypic Characteristics of Sequence Type 131 Isolates of the CTXM-15 Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Lineage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Volume 56 Number 12 p. 6358–636

HEIMER, S. R., RASKO, D. A., LOCKATELL, C. V., JOHNSON, D. E., & MOBLEY, H. L. (2004). **Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection.** *Infection and immunity*, 72(1), 593-597.

IBRAHIM, M., BILAL, N., & HAMID, M. (2012). **Increased multi-drug resistant *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum state, Sudan.** *African Health Sciences*, 12(3), 368–375.

ISLAND, M. D., CUI, X., FOXMAN, B., MARRS, C. F., STAMM, W. E., STAPLETON, A. E., WARREN, J. W (1998). **Cytotoxicity Of Hemolytic, Cytotoxic Necrotizing Factor 1-Positive And - Negative *Escherichia coli* To Human T24 Bladder Cells.** *Infect. Immun.* **66**, 3384-3389.

JOHNSON, J.R; O'BRIAN, T.T (2004). **Detection Of The *Escherichia coli* Group 2 Polysaccharide Capsule Synthesis Gene *Kspm* By A Rapid And Specific Pcr-Based Assay.** *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1773-1776.

JOHNSON, J. R. & STELL, A. L (2000). **Extended Virulence Genotypes Of *Escherichia coli* Strains From Patients Urosepsis In Relation To Phylogeny And Host Compromise.** *J. Infect. Dis.* **181**, 261-272.

JOHNSON, J. R., RUSSO, T. A (2002a). **Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: “The Other Bad *E Coli*”.** *J. Lab. Clin. Med.* **139**, 155-162.

JOHNSON, T. J., WANNENUEHLER, Y., DOETKOTT, C., JOHNSON, S. J., ROSENBERGER, S. C., NOLAN, L.K (2008). **Identification of Minimal Predictors Of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence For Use As A Rapid Diagnostic Tool.** *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3987-3996.

JOHNSON, T. J., SIEK, K. E., JOHNSON, S. J., & NOLAN, L. K. (2006). **DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains.** *Journal of bacteriology*, 188(2), 745-758.

KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L (2004). **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140.

KOGA, V. L., TOMAZETTO, G., CYOIA, P. S., NEVES, M. S., VIDOTTO, M. C., NAKAZATO, G., & KOBAYASHI, R. K. (2014). **Molecular screening of virulence**

genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *BioMed research international*, 2014.

KÖHLER, C., DOBRINDT, U. (2011). **What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?** *International Journal of Medical Microbiology*, v.301, p.642-647,

KUMAR, N. NAHID, F. ZAHRA, R. (2016). **Association of virulence factors, phylogenetic groups and antimicrobial resistance markers in *Escherichia coli* from Badin city, Pakistan.** *Journal of Chemotherapy* p 1-6

LAVIGNE, J.-P., VERGUNST, A. C., GORET, L., SOTTO, A., COMBESCURE, C., BLANCO, J., NICOLAS-CHANOINE, M.-H. (2012). **Virulence Potential and Genomic Mapping of the Worldwide Clone *Escherichia coli* ST131.** *PLoS ONE*, 7(3), e34294.

LAHEY CLINIC. β -Lactamases classifications: *KPC-type β -Lactamases*.
Disponível em: < <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1> > Acesso em Março 29, 2016.

LIVERMORE DM, WOODFORD N. (2006). **A ameaça da beta-lactamase em Enterobacteriaceae, Pseudomonas e Acinetobacter.** *Tendências Microbiol.* 14, 413-420.1016 / j.tim.2006.07.008

LE BOUGUENEC, C (2005). **Adhesins and Invasions Of Pathogenic *Escherichia coli*.** *Inter. J. Med. Microbiol.* **295**, 471-478.

LEE, J., B; SON, Y; KIM, D.H; PARK, H.S; KIM, J.M; KOO, S.H; KIM, H.J; CHOI, C.H. (2016). **Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea.** *Letters in Applied Microbiology* 62, 84-90

LIVERMORE, D. M. (2003). **Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact.** *Clinical infectious diseases*, 36(Supplement 1), S11-S23.

NAKAZATO, G., CAMPOS, T. A. D., STEHLING, E. G., BROCCHI, M., & SILVEIRA, W. D. D. (2009). **Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC).** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(7), 479-486.

MELLATA, M., DHO-MOULIN, M., DOZOIS, C. M., CURTISS III, R., BROWN, P. K., ARNÉ, P., FAIRBROTHER, J. M. (2003). **Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity.** *Infection and immunity*, 71(1), 536-540.

MELLATA, M. (2013). **Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends.** Foodborne pathogens and disease, Volume 10, Number 11. 916- 932

MITTAL, S., SHARMA, M., & CHAUDHARY, U. (2015). **Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*.** *Pathogens and global health*, 109(1), 26-29.

MORENO, E., G. PRATS, M. SABATE, T. PEREZ, J. R. JOHNSON., A. ANDREU. (2006). **Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*.** *J.Antimicrob.Chemother.* 57:204-211.

MORIEL, D. G., BERTOLDI, I., SPAGNUOLO, A., MARCHI, S., ROSINI, R., NESTA, B., SAVINO, S. (2010). **Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9072-9077.

PEIGNE, C., BIDET, P., MAHJOURB-MESSAI, F., PLAINVERT, C., BARBE, V., MÉDIGUE, C., & BONACORSI, S. (2009). **The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45: K1: H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model.** *Infection and immunity*, 77(6), 2272-2284.

PONNUSAMY. P, NATARAJAN. V, SEVANAN, M. (2012). **In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern.** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* p 210-213

RUSSO, T. A., & JOHNSON, J. R. (2000). **Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC.** *Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753-1754.

RUIZ, J., SIMON, K., HORCAJADA, J. P (2002). **Differences in Virulence Factors Among Clinical Isolates of *Escherichia coli* Causing Cystitis And Pyelonephritis In Women And Prostatitis In Men.** *J. Clin. Microbiol.* 40, 4445-4449.

RUSSO, T. A., MCFADDEN, C. D., CARLINO-MACDONALD, U. B., BEANAN, J. M., BARNARD, T. J., JOHNSON, J. R (2002). **Iron Functions As A Siderophore Receptor And Is A Urovirulence Factor In An Extraintestinal Pathogenic Isolate Of *Escherichia coli*.** *Infect. Immun.* 70, 7156–7160.

RUSSO, T. A; JOHNSON, J. R (2003). **Medical And Economic Impact Of Extraintestinal Infections Due To *Escherichia coli*: Focus On An Increasingly Important Endemic Problem.** *Microb. Infec.* 5, 449-456.

SABATÉ, M., MORENO, E., PÉREZ, T., ANDREU, A., PRATS, G (2006). **Pathogenicity Island Markers In Commensal And Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates.** *Clin. Microb. Infect.* **12**, 880-886.

SALDAÑA, Z., et al. (2009). **The *Escherichia coli* Common Pilus And The Bundle-Forming Pilus Act In Concert During The Formation Of Localized Adherence By Enteropathogenic *E. coli* .** *J. Bacteriol.* **191**, 3451-3461.

SKYBERG, J. A., JOHNSON, T. J., NOLAN, L. K. **Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid.** *BMC Microbiology*,v.8, p.1-8, 2008.

SAMEI, A., HAGHI, F., ZEIGHAMI, H. (2016). **Distribution of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates.** *Folia Microbiol* vol 61. P. 261–268

SANTOS, M. A. C., ZIDKO, M. A. C., PIGNATARI, C. A. C., GALES, A. C., SILVA, R. M (2009). **A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (expec) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro.** *O Mundo Da Saúde*, **33**, 392-400.

SILVA, G; MENDONÇA, N. (2012). **Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*.** *Virulence* 3:1, 18–28.

SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. (2012). **Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 48, n. 2, p. 91 – 99.

SOTO, S. M., M. T. JIMENEZ DE ANTA., J. VILA. (2006). **Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or - independent pathways, respectively.** *Antimicrob.Agents Chemother.* 50:649-653.

SUBASHCHANDRABOSE. S, MOBLEY, H. (2015). **Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia*.** *Microbiol Spectr.* August; 3(4)

SUKUMARAN, D., HATHA, A. A. M. (2015). **Antibiotic resistance and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from tropical estuary, south India.** *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(05), 496-504

TENAILLON, O., SKURNIK, D., PICARD, B., DENAMUR, E (2010). **The Population Genetics of Commensal *Escherichia coli*.** *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 207–217.

VANDEPUTTE-RUTTEN, L., KRAMER, R. A., KROON, J., DEKKER, N., EGMOND, M. R., GROS, P (2001). **Crystal Structure Of The Outer Membrane Protease OmpT From *Escherichia coli* Suggests A Novel Catalytic Site.** *Embo J.* **20**, 5033-5039.

WOODFORD, N., FAGAN, E. J., ELLINGTON M J. (2005). **Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum b-lactamases.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 154-155.

ZHAO, L., GAO, S., HUAN, H., XU, X., ZHU, X., YANG, W., LIU, X. (2009). **comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model.** *Microbiology*, 155(5), 1634-1644.

ZHANG, L., LEVY, K., TRUEBA, G., CEVALLOS, W., TROSTLE, J., FOXMAN, B., EISENBERG, J. N. (2015). **Effects of selection pressure and genetic association on the relationship between antibiotic resistance and virulence in *Escherichia coli*.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(11), 6733-6740.

3 ARTIGO CIENTIFICO

Journal of Medical Microbiology (2017)

COMPARISON OF VIRULENCE FACTORS OF UROPATHOGENIC *Escherichia coli* SENSITIVE AND MULTIRESISTENT to ANTIMICROBIALS.

Autores: Laura. P. Abshana¹, Gerson Nakazato¹, Rosemary. C. Rocha¹, Vanessa, Koga¹, Paula S. Cyويا, ¹, Larissa C. de Camargo¹, Erick K. Nishio¹, Eliana C. Vespero¹, Marcelly C. Gonçalves¹, Renata K. T. Kobayashi¹

¹ Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Correspondence:

*Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia - CCB. Campus
Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, Caixa Postal 6001, 86051-980, Londrina,
Paraná,

Brazil. Tel. 55 (43) 33714396, Fax number.55 (43) 33714788.

Email: kobayashirkt@uel.br

ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* isolates may have specific virulence factors such as adhesins, proteases and toxins, iron capture systems and protective factors against the immune system, providing greater adaptability to new environments and colonization, becoming the main etiological agent of urinary tract infections. The relationship between antimicrobials and virulence in *E. coli* has been documented, suggesting an important genetic association. The objective of this study was compared the frequency of the main virulence factors in UPEC sensitive and multiresistant to antimicrobials. In this study, 50 multidrug resistant *E. coli* strains (MDR UPEC), 50 antimicrobial-sensitive UPEC strains (non-MDR UPEC) and 52 faecal microbiota *E. coli* strains were studied. The molecular screening to the major virulence genes were made by PCR. Fifteen virulence genes and pathogenicity islands were investigated and it was observed that these were more present in MDR UPEC, wich belonging mostly to the phylogenetic group B2, different from the commensal strains that belonging to group B1 and A. Phenotypic test results showed a higher capacity for invasion (34%) in the UPEC strains compared to the commensal isolates (8%). MDR UPEC are strong biofilm producers in comparison with non-MDR UPEC and commensal *E. coli*. Studies that correlate resistance and virulence favor a better understanding of the pathogenesis of these microorganisms. Therefore, these data confirm that multiresistant UPEC may be more virulent than non-MDR UPEC and commensal *E. coli* strains, alerting the danger of the dissemination of these strains.

Key words: Virulence Factors (VFs), Pathogenicity Islands, Multidrug resistance, Bacterial Biofilm, Bacterial Invasion

3.1 INTRODUCTION

Urinary tract infections (ITUs) are the most frequent bacterial infectious diseases in humans at all ages, being Uropathogenic *E. coli* (UPEC) the main etiological agent (FOXMAN, 2010; DALE; WOODFORD, 2015). UPEC are able to colonize the urinary tract and cause cystitis and pyelonephritis, which can lead to urosepsis (KAPER et al., 2004; KOHLER, 2011).

The UPEC pathogenicity is multifactorial, being dependent of numerous virulence factors (VFs). These VFs facilitate adherence to and colonization of host epithelial surfaces, cellular invasion, ascent to the bladder and kidneys, evasion of host defences and damage to host cell (AGARWAL et al., 2013; KUMAR et al., 2016). These VFs are encoded on plasmids or on the bacterial chromosome, where they are usually located within pathogenicity islands (PAIs) (SABATÉ et al., 2006; SAMEI et al., 2016).

UPEC is also capable of forming bacterial biofilms, which confer important advantages to microorganisms such as resistance to dehydration and oxidation and greater tolerance to detergents and antibiotics. Several pathogenic *E. coli* or commensal strains are able to colonize surfaces by the expression of adhesion as flagellum, conjugative pili, extracellular polysaccharides and curli, forming the bacterial biofilm (MITTAL, 2012; EJRNAES et al., 2011b).

According to Clermont et al. (2013), *E. coli* isolates can be classified into 7 phylogenetic groups: A, B1, B2, C, D, E, F. Numerous studies have shown the relationship between phylogeny and pathogenicity of *E. coli* strains. Phylogenetic groups A and B1 include commensal *E. coli* strains, whereas extraintestinal pathogenic *E. coli* strains belong to phylogenetic group B2 and to a smaller extent to group D (MICENKOVÁ et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Despite this association with virulence, MASSOT et al. 2016 found no difference in antimicrobial resistance profiles among phylogenetic groups.

The importance of pathogens has increased in recent years, particularly due to the global emergence of hyper-virulent and antibiotic resistant strains. In this context, multidrug resistance UPEC isolates makes treatment difficult and is associated with the increased health care costs and significant economic losses, becoming a serious problem for public health (DALE AND WOODFORD, 2015). An increasing body of evidence, derived mainly from epidemiological and in vitro studies, explores the associations

between specific VFs and antimicrobial resistance (AL-BAYSSARI et al., 2015, SILVA, LINCOPAN, 2012).

Some studies have documented positive and negative relationships between antimicrobial resistance and virulence in *E. coli* strains. Soto et al (2006) suggested a loss of islands of quinolone resistance-induced pathogenicity, this reduction in virulence genes has also been reported for trimethoprim/sulfamexazole resistant strains (MORENO et al., 2006). However, studies on the molecular mechanisms of resistance and virulence suggest genetic association, by the presence of plasmids (MDR) that favor the simultaneous expression of virulence factors and genetic resistance factors (BARIGYE et al., 2012; ZHANG et al., 2015).

In order to answer the controversies that show that resistance and virulence may or may not be associated, the aim of the present study was to analyze possible associations between characteristics of UPEC (VFGs, phylogenetic classification, pathogenic islands, biofilm formation and invasion of HEp-2 cells) multiresistant and sensitive to antimicrobials.

4.2 METHODS

4.2.1 Bacterial isolates: A total of 152 *E. coli* strains were tested, being 50 multidrug-resistant UPEC strains (MDR UPEC). Of these, 42 were extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing UPEC strains and 8 strains UPEC resistant to carbapenemase, 50 UPEC strains antimicrobials sensitive, named in this article as non-MDR UPEC strains, and 52 faecal commensal strains from healthy host from the collection of the Laboratory of Basic and Applied Bacteriology from State University of Londrina (KOGA et al., 2014). The pathogenics strains were collected from the University Hospital of the State University of Londrina (UEL/Pr) during the year 2008-2012, isolated and identified by the hospital's Clinical Microbiology Laboratory at Vitek 2 Biomérieux system 2. This study was approved by the Human Research Ethics Committee - UEL (Process 23335/08). Strains were stored in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, Livonia, USA) with 20% glycerol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) media at -80 °C.

4.2.2 Antimicrobial susceptibility testing: It was performed using the standard disk-diffusion method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016). The following antimicrobials were tested: ciprofloxacin (5 µg), levofloxacin (5 µg); ertapenem (10 µg), gentamicin (10 µg), norfloxacin (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg); amikacin (30 µg), aztreonam (30 µg), cefazolin (30 µg), cefepime (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg); nitrofurantoin (300 µg), piperacillin + tazobactam (100/10 µg); trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg); and amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg) (Oxoid Ltd. Basingstoke, Hants, UK).

4.2.3 PHENOTYPIC ANALYSIS OF THE MAIN VIRULENCE FACTORS

Invasion assay: The test to detect invasion of strains to HEp-2 cells were realized as previously described by Sansonetti et al. (1986), with slight modifications. The HEp-2 cells were grown in 24-well tissue culture microplates (BD Falcon, Bedford, MA, USA). The bacterial was incubated in LB medium at 37 °C overnight. The HEp-2 cells were washed 3 times with PBS (0.01M, pH 7.2). Then, 50 µl of the bacteria was plated on 950 µl of DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) supplemented with 4% SFB and incubated for 1h and 30min (infection period) at 37 °C. The cell monolayers were washed 3 times with PBS to eliminate bacteria not adhering to the cells. Then was added 1 ml of DMEM supplemented with 4% SFB and gentamicin, imipenem or amikacin (50µg/ml) and incubated for a further 1h and 30min. The microplates werewashed 3 times with PBS, to eliminate non-invasive cells. Then was added 1ml of 1% Triton in PBS to lyse the cells and release the bacteria have invaded. After 10 min 0.1 ml was plated on LB agar spread with Drigalsky handle, incubated for 24 hours at 37 °C. The result was given in CFU/ml by multiplying the number of colonies by the dilution fator (MARTINEZ et al., 2009). *E. coli* enteroinvasive (EIEC) O152 was used as a positive control and *E. coli* HB101 was used as a negative control.

Confirmation of the results of the invasion test using cell lines: 19 isolates with positive results in the HEp-2 cell invasion test and simultaneously resistance to gentamycin (antimicrobials used in the test) were confirmed. The minimum inhibitory concentration (MIC) test for all isolates was determined and the concentration used was Imipenem (40 µg/ml) and Amikacin (640 µg/ml).

Quantitative biofilm assay: To assess biofilm formation, we inoculated 200 μ l of Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.45% glucose in 96-well flat-bottom microtiter polystyrene plates (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) with 20 μ l of an overnight Luria broth culture grown at 37°C with shaking. The strain was incubated overnight (18 hours) at 37°C and visualized by staining with 0.5% crystal violet for five minutes after washing with water. The biofilm was quantified in triplicate, after adding 200 μ l of 95% ethanol, by an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader at 570 nm. Strain EAEC 042 was used as a positive control and *E. coli* HB101 was used as a negative control (WAKIMOTO et al., 2004).

4.2.4 GENOTYPIC ANALYSIS

Virulence factor genes: Fifteen genes encoding virulence factors were investigated. The oligonucleotide sequence and conditions of polymerase chain reaction (PCR) are in the table 3.

TABLE 3. Sequence of primers used in PCR for virulence genes

	Gene	virulence factors	Oligonucleotide Sequence (5'→3')	Fragment Size (bp)	References
Adhesin	<i>ecpA</i>	<i>E. coli</i> common pilus	TGAAAAAAAAAGGTTCTGGCAATAGC CGCTGATGAGGAGAAAAGTGAA	482	BLACKBURN et al., 2009.
	<i>papC</i>	Fimbria P	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328	LEBOUGUEEC et al., 1992.
	<i>papG</i>	Fimbria P	CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	1070	JOHNSON; STEEL, 2000.
Invasive	<i>IbeA</i>	Invasion of brain endothelium	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170	JOHNSON; STEEL, 2000.
Prot Iron acquisition	<i>iroN</i>	Salmochelins receptor	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	553	JOHNSON et al., 2008
	<i>iutA</i>	Aerobactin receptor	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCCGGAAACGGGTAGAATCG	302	JOHNSON et al., 2008.
	<i>fyuA</i>	Yersiniabactin receptor	TGATTAACCCCGCGACGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880	JOHNSON; STEEL, 2000.
	<i>ompT</i>	Outer membrane protease T	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	JOHNSON et al., 2008

Toxin	<i>traT</i>	Increased serum survival	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG GGTGTGGTGCATGAGCACAG	290	JOHNSON; STEEL, 2000.
	<i>kpsII</i>	kpsM II group 2 capsule	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272	YAMAMOTO et al., 1995.
	<i>cvaA</i>	Colicin V	ACCAGGGAACAGAGGCCACCCGGCGTATT ATCCGGGCGTTGTCTGACCGGAAAGTTG	319	JOHNSON et al, 2006
	<i>Iss</i>	Increased serum survival	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	JOHNSON et al., 2008
	<i>hlyF</i>	Haemolysin F	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	JOHNSON et al., 2008.
	<i>hlyA</i>	Haemolysin A	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGC ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTC	1177	JOHNSON; STEEL, 2000.
	<i>Tsh</i>	Temperature sensitiv haemagglutinin	GGTGGTGCCTGGAGTGG AGTCCAGCGTGATAGTGG	620	DOZOIS et al., 2000.

PCR Amplification of *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M, and *bla*KPC Determinants:

The isolates of MDR UPEC strains were tested for *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M and *bla*KPC gene amplification. The oligonucleotide primers used for the PCR assays are specified in table 4.

TABLE 4 - Sequences of oligonucleotides and size of the amplified fragment (bp) for the study of resistance genes.

Gene	Oligonucleotide Sequence (5'→3')	Fragment Size (bp)	References
CTX-M1	5' AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC 5' AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	415	WOODFORD et al., 2005
CTX-M2	5' CGACGCTACCCCTGCTATT 5' CCAGCGTCAGAT TTT TCA GG	552	WOODFORD et al., 2005
CTX-M9	5' CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG 5' ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	205	WOODFORD et al., 2005
CTX-M8	5' TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	666	WOODFORD et al., 2005
CTX-M25	5' GCA CGA TGA CAT TCG GG 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	327	WOODFORD et al., 2005
TEM	5' ATGAGTATTCAACATTTCCG 5' CCAATGCTTAATCAGTGAGG	858	BEDENIC' et al., 2001
SHV	5'-ACTGAATGAGGCGCTTCC-3' 5'ATCCCGCAGATAAAATCACC-3'	713	ARLET, G; G. PHILIPPON 1991
KPC	5'-ATGTCAGTGTATCGCCGTCT-3' 5'TTTTCAGAGCCTTACTGCCC-3'	803	BRADFORD et al., 2004

Phylogenetic classification: The *E. coli* isolates were assigned to one of the seven main phylogenetic groups: A, B1, B2, C, D, E and F, according to the combination of genetic

determinants: *chuA*, *yjaA*, *arpa*, *trpA* and the DNA fragment TSPE4.C2 as described by Clermont and colaboradores (2013).

Pathogenic islands: Detection of 7 pathogenic islands described in UPEC: PAI III536, PAI IV536, PAI IICFT073, PAI I536, PAI II536, PAI IJ96 and PAI ICFT073 (SABATÉ et al., 2006) was performed by PCR (Table 5).

TABLE 5 - Islands-encoded virulence factors of pathogenicity, oligonucleotide sequence and amplified fragment size.

PAI (Gene)	Primer sequence (5'→3')	PCR product (bp)	Virulence determinants
PAI I536 <i>I.9</i> <i>I.10</i>	5'TAATGCCGGAGATTCATTGTC'3 5'AGGATTGCCTCAGGGCTTT'3	1800	α-Haemolysin, CS12 fimbriae and F17-like fimbrial adhesin
PAI II536 <i>Orf1 up</i> <i>Orf1 down</i>	5'CATGTCCAAAGCTCGAGCC'3 5'CTACGTCAGGCTGGCTTTG'3	1000	α-Haemolysin, P-related fimbriae, hemagglutinin-like adhesion, Hek adhesion, P fimbriae, iron-regulated proteins S fimbriae, salmochelin, HmuR-like heme receptor, Sat toxin, Tsh-like haemoglobin protease, antigen 43
PAI III536 <i>sfaAI.1</i> <i>sfaAI.2</i>	5'CGGGCATGCATCAATTATCTTTG'3 5'TGTGTAGATGCAGTCACTCCG'3	200	Yersiniabactin siderophore system
PAI IV536 <i>IRP2FP</i> <i>IRP2 RP</i>	5'AAGGATTCGCTGTTACCGGAC'3 5'TCCTCGGGCAGCGTTTCTTCT'3	300	α-Haemolysin, and P-fimbriae
PAI IJ96 <i>papGlf</i> <i>papGlr</i>	5'TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT3 5'TGGCATCCCACATTATCG'3	400	α-Haemolysin, P-fimbriae and aerobactin
PAI I <i>CFT073 RPAi</i> <i>RPAf</i>	5'GGACATCCTGTTACAGCGCGCA'3 5'TCGCCACCAATCACAGCGAAC'3	930	P-fimbriae and iron-regulated genes
PAI IIcft073 <i>cft073.2Ent1</i> <i>cft073.2Ent2</i>	5'ATCGATGTTGTATCGCGC'3 5'ACGAGCATGTGGATCTGC'3	400	

Source: SABATÉ et al.,2006; SCHMIDT; HENSEL, 2004.

4.2.5 Statistical analysis: All frequencies comparisons among different groups were performed with Fisher's exact test and the Chi-square test. Findings were considered

significant for $p < 0.05$. The tests were performed with the statistical program R version 3.1.0.

4.3 RESULTS

Prevalence of antimicrobial resistance among strains

The resistance profile of the *E. coli* isolates to antimicrobial compounds is given in Table 6. All *E. coli* isolates were sensitive to meropenem.

The disk diffusion test indicated the high resistant rates for the isolates MDR UPEC strains for Cefotaxime (98%), Cefazolin (100%), Levofloxacin (74%), Trimethoprim-Sulfamethoxazole (74%) and Ciprofloxacin (64%). The strains were resistant to Trimethoprim-Sulfamethoxazole (46%) Levofloxacin (40%), Ciprofloxacin (40%), this isolates showed sensitivity to Meropenem, Nitrofurantoina, Aztreonam and Ertapenem.

Table 6: Results antimicrobial resistance in MDR UPEC, non-MDR UPEC and commensal *E. coli*.

Antibiotic		ANTIMICROBIAL RESISTANCE (%)		
		MDR UPEC n (%)	non-MDR UPEC n (%)	Commensal <i>E. coli</i> n (%)
Cephalosporinas	Cefepime CPM	30 (60)*†	1 (2)	0 (0)
	Cefotaxime CTX	49 (98) *†	2 (4)	0 (0)
	Ceftazidime CAZ	27 (54)*†	0 (0)	0(0)
	Cefazolin CFZ	50 (100)*†	5 (10)	2 (4)
Carbapenems	Imipenem IMP	5 (10) *†	1 (2)	0 (0)
	Ertapenem ERT	7 (14) *†	0 (0)	0 (0)
	Meropenem MPM	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Aminoglycosides	Gentamicin GEN	20 (40)*†	9 (18) *	0 (0)
	Amikacin AMI	8 (16) *†	2 (4)	0 (0)
Sulfonamides	Trimethoprim-Sulfa SUT	32 (64)*†	23 (46) *	3 (6)
Quinolones	Ciprofloxacin CIP	36 (72)*†	20 (40) *	1 (2)
	Levofloxacin LEV	37 (74)*†	20 (40) *	2 (4)
Monobactams	Aztreonam ATM	27 (54) *†	0 (0)	0 (0)
Penicilins	Pip-tazobactam PIT	12 (24)*†	1 (2)	0 (0)
Furans	Nitrofurantoina NIT	8 (16)*†	0 (0)	1 (2)

Kirby–Bauer sensitivity tests

*Comparison between MDR UPEC and non-MDR UPEC

† Comparison between MDR UPEC and commensal *E. coli*

• Comparison between non-MDR UPEC and commensal *E. coli*

Commensal *E. coli* strains showed low percentages of resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole (6%), Levofloxacin (4%), Cefazolin (4%) and Ciprofloxacin (2%). Furthermore, all commensal *E. coli* were sensitive of piperacilin, amikacin, gentamicin, cefepime, imipenem, cefotaxime, aztreonam, ertapenem and ceftazidime.

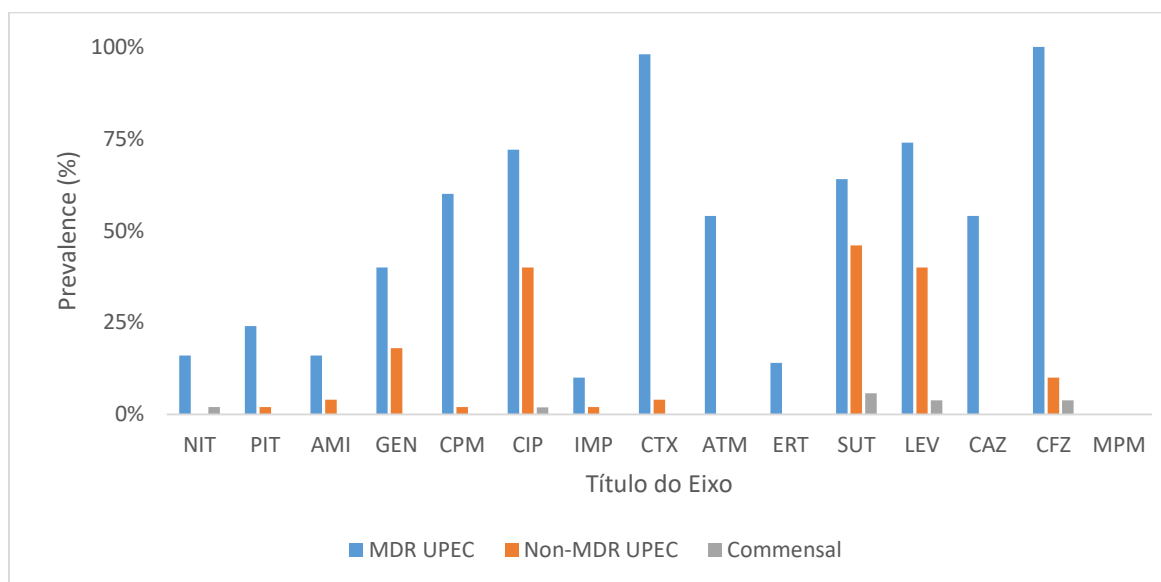


Figure 1: Resistance pattern of isolates in the Kirby–Bauer sensitivity tests

The MDR UPEC strains were more resistant to the antimicrobials than non-MDR UPEC strains and commensal strains, with statistically significant differences to all antimicrobials tested ($p < 0.05$). Except for meropenem, for which all strains analysed were sensitive.

Occurrence of ESBL and KPC genes: Of the 50 MDR UPEC strains, 42 were phenotypically identified as ESBL and 8 as KPC-producing strains by Vitek 2 Biomérieux system 2. Among the 42 ESBL-producing UPEC strains, 32 harbored CTX-M beta-lactamases genes. The most frequently found, with statistically significant association ($p < 0.05$) was CTX-M-2 group, found in 11 isolates (26%). Followed by CTX-M-1, CTX-M-8 and CTX-M-9 group, found in 7 isolates each (17%). The remaining strains possessed *bla*TEM and *bla*SHV determinants (2 and 3 isolates, respectively). About the 8 KPC-producing UPEC strains, seven harbored *bla*KPC gene.

Frequency of virulence genes: High frequency of *ecpA* gene was detected in all strains, in MDR UPEC (94%), non-MDR UPEC (96%) and commensal *E. coli* strains (96.1%), with no statistically significant association ($p>0.05$). In the MDR UPEC strains, the most prevalent genes were *iutA* (70.0%), *traT* (58.0%), *fyuA* (44.0%), *tsh* (42.0%) and *papC* (32.0%) gene. The most prevalent in non-MDR UPEC strains were *traT* (68.0%), *fyuA* (68.0%), *kpsII* (58.0%), *hlyA* (58.0%), *iutA* (40.0%). Finally, in commensal *E. coli* strains was detected the gene *cvaA* (55.8%), *fyuA* (48.08%) and *traT* (32.7%) (Table 7). When analyzing the main virulence factors genes and their distribution for each group of isolates we observed high presence of different virulence genes in MDR UPEC and non-MDR UPEC in comparison with commensal *E. coli* strains. In both UPEC strains, MDR UPEC and non-MDR UPEC strains, the presence of the *ironN*, *iutA*, *traT*, *ompT* and *papC* genes was higher than in the microbiota, with difference statistically significant ($p<0.05$) (Table 7). The *tsh* gene was more frequent in MDR UPEC strains than non-MDR UPEC strains, and *fyuA*, *hlyA* and *kpsII* genes were more frequent in non-MDR UPEC strains than MDR strains, with difference statistically significant ($p<0.05$).

Table 7: Frequency of virulence genes, distribution of PAI markers and phylogenetic classification in MDR UPEC, non-MDR UPEC and commensal *E. coli* .

	Gene of virulence	MDR UPEC (n=50) %	non-MDR UPEC (n=50) %	commensal <i>E. coli</i> (n=52) %
<i>Adhesin</i>	<i>ecpA</i>	47 (94.0)	48 (96.0)	50 (96.1)
	<i>papC</i>	16 (32.0) [†]	15 (30.0) [*]	6 (11.5)
	<i>papG</i>	11 (22.0)	13 (26.0)	6 (11.5)
<i>Invasive</i>	<i>IbeA</i>	4 (8.0)	5 (10.0) [*]	0 (0.0)
<i>Iron acquisition</i>	<i>iroN</i>	15 (30.0) [†]	16 (32.0) [*]	5 (9.6)
	<i>iutA</i>	25 (50.0) [†]	20 (40.0) [*]	0 (0.0)
	<i>fyuA</i>	22 (44.0)	34 (68.0) ^{**}	25 (48.1)
<i>Protectin</i>	<i>ompT</i>	9 (18.0) [†]	9 (18.0) [*]	2 (3.8)
	<i>traT</i>	29 (58.0) [†]	34 (68.0) [*]	17 (32.7)
	<i>kpsII</i>	9 (18.0)	29 (58.0) ^{**}	11 (21.2)
	<i>cvaA</i>	14 (28.0)	13 (26.0)	29 (55.8) ^{†*}
	<i>iss</i>	14 (28.0) [†]	8 (16.0)	5 (7.7)
<i>Toxin</i>	<i>hlyA</i>	9 (18.0)	29 (58.0) ^{**}	5 (9.6)
	<i>hlyF</i>	9 (18.0)	7 (14.0)	3 (5.7)
Pathogenicity Islands				
	PAI I536	13 (26) [†]	7 (14)	3 (6)
	PAI II536	18 (36) ^{*†}	5 (10)	3 (6)
	PAI III536	26 (52) ^{*†}	0 (0)	1 (2)
	PAI IV536	16 (32)	36 (72) ^{**}	24 (46)
	PAI IJ96	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	PAI ICFT073	28 (56) [†]	30 (60) [*]	10 (19)
	PAI IICFT073	14 (28) [†]	19 (38) [*]	6 (12)
Phylogenetic classification				
	A	1 (2)	4 (8)	11 (21) ^{†*}
	B1	9 (18)	11 (22)	19 (37)
	C	7 (12)	2 (4)	2 (4)
	E	6 (12)	3 (6)	1 (2)
	D	7 (14)	3 (6)	10 (19)
	F	4 (8) [†]	5 (10) [*]	0 (0)
	B2	15(30)	18 (37)	8 (15)
	Desconhecido	1(2)	4 (8)	1 (2)

All genes were detected by PCR.

*Comparison between MDR UPEC and non-MDR UPEC

† Comparison between MDR UPEC and commensal *E. coli*

* Comparison between non-MDR UPEC and commensal *E. coli*

Distribution of PAI markers: The results show the high frequency of PAI ICFT073 (56%), PAI III536 (52%), PAI II536 (36%), PAI IICFT073 (28%) and PAI I536 (26%) in MDR UPEC strains when compared to the commensal *E. coli* strains, with statistically

significant differences ($p < 0.05$). In the non-MDR UPEC strains, PAI IV536 (72%), PAI ICFT073 (60 %) and PAI IICFT073 (38 %) were most frequent than commensal *E. coli* strains, with statistically significant differences ($p < 0.05$). In commensal *E. coli* strains the frequency of PAI was lower than UPEC strains, some strains harbored PAI IV536 (46%), PAI ICFT073 (19%) and PAI IICFT073 (12%). PAI IJ96 were not detected in none strains. The frequency of each PAI marker in the groups are shown in Table 7.

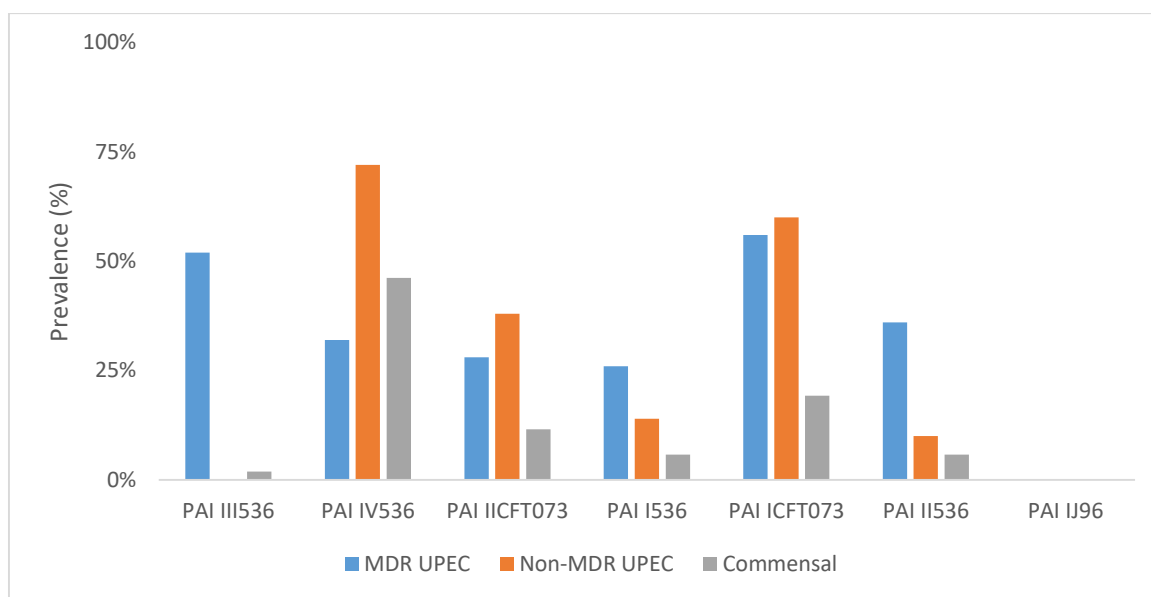


Figure 1: Distribution of PAI markers in MDR UPEC, non-MDR UPEC and commensal *E. coli*

Phylogenetic classification: The PCR method was used to classify all isolates among the seven main phylogenetics groups. Among the UPEC strains, the phylogenetic group B2 was the most frequent in MDR UPEC (30%) and non-MDR UPEC strains (37%), followed by group B1 (20% and 21% respectively). The group F was found only in MDR UPEC (8%) and non-MDR UPEC (10%) ($p < 0.05$), being absent in commensal *E. coli* strains. In this group, commensal *E. coli* strains, we observed a high percentage to groups B1 (37%), A (21%) and D (19%). The phylogenetic group A is more frequent in commensal *E. coli* strains comparing with UPEC strains ($p < 0.05$) (Table 7).

PHENOTYPIC ANALYSIS

Table 8: Formation of biofilms and invasion rate in MDR UPEC, non-MDR UPEC and commensal *E. coli*

Formation of biofilms			
	MDR UPEC (n=50) %	non-MDR UPEC (n=50) %	commensal <i>E. coli</i> (n=52) %
NOT PRODUCE BIOFILM OD ₅₇₀ < 0.1	25 (50.0%)	45* (90.0%)	51† (98.1%)
MODERATE BIOFILM OD ₅₇₀ 1.0- 2.0	12*† (24.0%)	3 (6.0%)	1 (1.9%)
STRONG BIOFILM OD ₅₇₀ > 2.0	13*† (26.0%)	2 (4.0%)	0 (0.0%)
Invasion rate in HEp-2 cells			
INVASION RATE	22*† (44%)	12* (24%)	4 (8%)

All genes were detected by PCR.

*Comparison between MDR UPEC and non-MDR UPEC

† Comparison between MDR UPEC and commensal *E. coli*

* Comparison between non-MDR UPEC and commensal *E. coli*

Among the strains that produced strong biofilm and moderate biofilm, most belonged to the MDR UPEC ($p < 0.05$) (Table 8). The MDR UPEC strains produced a strong biofilm (26%) and moderate biofilm (24%) and half of strains in this group not produce biofilm. By the other wise, most of non-MDR UPEC (90%) and commensal *E. coli* (98.1%) strains not produced biofilm ($p < 0.05$). About the capacity of invasion HEp-2 cells, MDR UPEC were the ones that invaded HEp-2 cells the most ($p < 0.05$) (Table 8). Twenty-two (44%) MDR UPEC strains were invasive, however 38 (76%) of non-MDR UPEC and 48 (92%) of commensal *E. coli* strains were non-invasive.

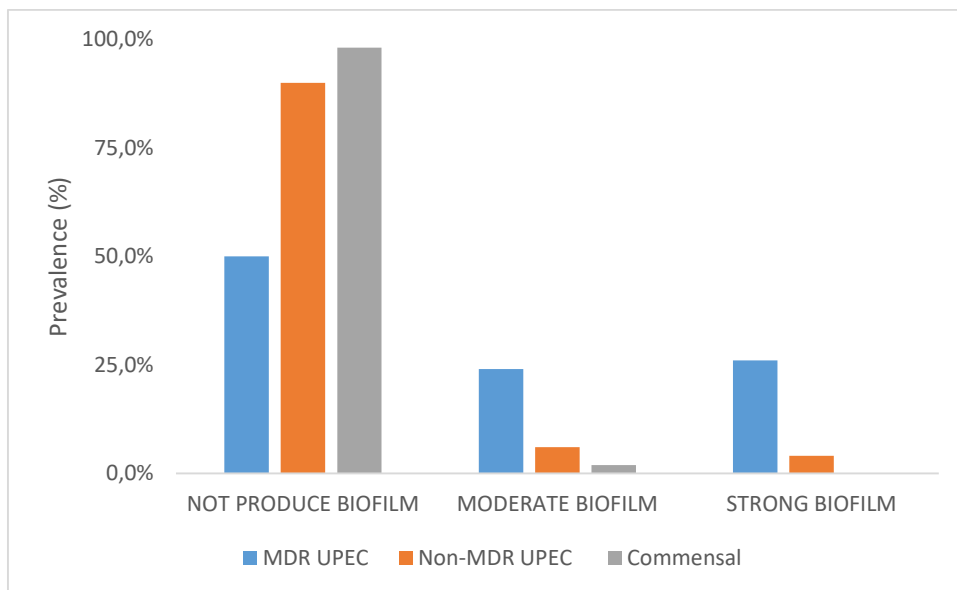


Figure 4: Formation of biofilms in MDR UPEC, non-MDR UPEC and commensal *E. coli*.

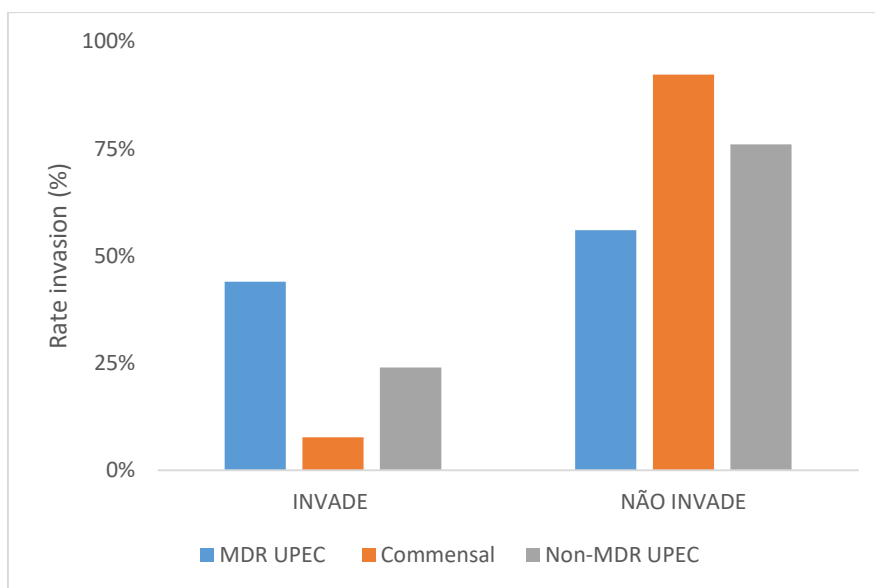


Figure 5: Invasion of rate in MDR UPEC, non-MDR UPEC and commensal *E. coli*.

4.6 DISCUSSION

There are many controversies regarding the relationship between virulence and multidrug resistance, including the role of increasing resistance in relation to fitness costs. Sometimes, the increased resistance is associated, either directly or indirectly, with decreased virulence and fitness (BECEIRO et al., 2013). Sukumaran and collaborators (2015) demonstrated that resistance to antibiotics is significantly associated with the absence of virulence genes, which was interpreted as loss of virulence factors concomitant with mutations that lead to resistance.

However, evidence also shows the opposite, and it is increasingly evident that the association of resistance and virulence is often of greater benefit to the pathogen, resulting in a growing public health problem. This study lightened a lot of points of this question. We compared MDR UPEC, non-MDR UPEC and commensal *E. coli* strains as the presence of the virulence factors genes, pathogenicity islands genes phenotypical capacity of biofilm producing, HEp-2 cells invasion, and phylogenetic classification, and many comparative results showed the higher virulence of MDR UPEC strains with a statistically significant difference ($p < 0.05$).

In a study of Dubois and collaborators (2009) was reported that one plasmid that encoded the beta-lactamase did not increase the incidence of meningitis in a newborn mouse model, thus suggesting that the CTX-M type enzyme does not increase the virulence of *E. coli* in this animal model. In another study, it was examined the ability of ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates and non producing to express type 1 and 3 fimbrial adhesins, which are important traits in microbial adherence and invasion of host cells, and both showed the same capacity to adherence and invasion (SAHLY et al., 2008; SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY; 2015).

In our results, the MDR UPEC strains were more invasive in lines cells when compared with non-MDR UPEC and commensal *E. coli* strains, corroborating with others studies. Sahly and collaborators (2008) demonstrated that the proportion of strains able to invade ileocecal and bladder epithelial cells was significantly higher among ESBL producers, than among non-ESBL producers. The data demonstrated that an ESBL carrier plasmid appeared to upregulate the expression of one or more genes, resulting in a higher invasion capacity (BECEIRO, 2013).

The presence of biofilm favors the reduction of bacterial susceptibility to antimicrobial agents and resistance to the defense mechanisms of the immune system. In

our study, it was determined that the isolates multiresistant to antimicrobials had a higher biofilm formation in relation to the other isolates, which was also observed by PONNUSAMY et al. (2012) because they indicated that strong biofilm producers were less susceptible to antimicrobial agents than non-producers in uropathogenic *E. coli*.

Recently, several different prevalence rates of virulence determinants were related to UTIs in different countries (DERAKHSHANDEH, 2015; LEE et al., 2016). Furthermore, UPEC strains are genetically more diverse and may share a lot of virulence determinants, being genes encoding fimbrial adhesive systems the most common. The adhesion factors promote colonization, invasion, and replication within uroepithelial cells (MULVEY, 2002) and precede the expression of other bacterial products such as toxins, iron acquisition systems, and host defense avoidance mechanisms (protectins), which are encoded on PAIs or plasmids (BIDET et al., 2012; SAMEI et al., 2016).

The most prevalent adhesion genes found in our study were *papC* in MDR UPEC (32.0%) and non-MDR UPEC (30.0%) strains, with statistically significant differences when compared with commensal strains (11.5%) (Table 7). These findings are in agreement with those previously reported for UPEC strains isolated from patients with community-acquired UTIs (ZHAO et al., 2009; SAHLY et al., 2008).

The *cvaA* gene encoding a bacteriocin were more frequent in commensal isolates than in the other groups, similar to the study by Micenková and collaborators (2016) who found that colicin determinants were less prevalent among ExPEC strains compared to fecal strains. The production of colicins and microcines (bacteriocins) is an important feature of pathogenic and also commensal *E. coli* strains and play an important role in bacterial competition, in addition to antimicrobial activity (MICENKOVÁ et al., 2014).

In this study, the presence of the *iroN*, *iutA*, *traT*, *ompT* and *papC* genes were less frequent, statistically, in microbiota comparing with the other strains of UPEC. According to some authors, the *traT* gene is more commonly found in ESBL or multidrug resistant strains than commensal *E. coli*, which could be because the resistant strains carries more plasmids (Oliveira et al., 2011; MELLATA et al., 2013).

Iron is an essential element for the survival of *E. coli* and important to numerous cellular activities (BRAUN, 2001). In this study, iron acquisition system genes, as *iutA* and *iroN*, were more frequent in UPEC strains than commensal *E. coli* strains. However, *fyuA* gene was more frequent in non-MDR UPEC than MDR UPEC and commensal *E. coli* strains (Table 7). This gene can be harbored in PAI IV536 (SABATÉ et al., 2006), and this PAI was the most frequent in our non-MDR UPEC strains. The prevalence rates

obtained in our study were higher than those previously described for UPECs, indicating that frequencies of iron acquisition system genes vary according to geographic location and host (SUBASHCHANDRABOSE, MOBLEY; 2015).

The percentage of strains with toxin coding genes *hlyA* was high in the non-MDR UPEC (58.0%), indicated that the strains have the potential to produce toxins (MARRS et al., 2005). This gene can be harbored in many PAI, among them PAI ICFT073, one of the most frequent in non-MDR UPEC.

In our study, six PAI markers was detected, whereas PAI IJ96 was not detected in any of the isolates. According to our results and previous studies, some isolates of *E. coli* from the intestinal tract of healthy people can be considered potentially virulent, some commensal *E. coli* strains showed PAI markers. Already, it has been reported that UPEC can asymptotically colonize the intestinal tract (KOGA et al., 2014). Among MDR UPEC strains, the most prevalent PAI marker was PAI ICFT073 (56.0 %), followed by PAI III536 (52 %). Our results were similar with other studies, mainly in the distribution of PAI marker among isolates (CYOIA et al., 2015).

In the results of the phylogenetic groups were observed in the pathogenic isolates higher prevalence of phylogenetic group B2 and B1 when compared to the fecal isolates that presented a higher prevalence of phylogenetic group B1 and A ($p < 0.05$). Group B2 is associated with extraintestinal pathogenic *E. coli* and group A with commensal strains (Clermont et al., 2013). Similar results were presented in other studies (CYOIA et al., 2015, MICENKOVÁ et al., 2014, KOGA et al., 2014).

These findings reflect the heterogeneity in the distribution of virulence genes and the complex and multifactorial characteristic of UPEC virulence (JOHNSON; STELL, 2000). In our study, several distinct patterns were found among the UPEC strains regarding the number of virulence genes and their distribution among the strains (Table 7), a result also found in other studies (JOHNSON; STELL, 2000; MARRS et al., 2002). High heterogeneity of the composition of virulence associated genes was found, mainly in the isolates of *E. coli* producing ESBL.

The emergence of *E. coli* isolates that have multiple antibiotic resistant phenotypes has been previously reported and is considered a serious health concern (ALBASARY, 2015). The high prevalence of multiple antibiotic resistance in UPECs may be related with the frequent use of these drugs to treat UTIs in Brasil (SILVA; LINCOPAN, 2012). Of particular concern is the finding that a high percentage of *E. coli* strains are resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole, nitrofurantoin and

ciprofloxacin, because are the therapeutic agents used for the social security health system in many countries.

In our study MDR UPEC strains showed high resistance to many antimicrobials, at least half of these strains were resistant to cefepime, cefotaxime, ceftazidime, cefazolin, trimethoprim-sulfa, ciprofloxacin, levofloxacin and aztreonam, showing statistically significant differences for these antimicrobials to the other groups ($p < 0.05$). This group demonstrated the presence of the different combinations of virulence markers, confirming the coexistence of virulence and resistance phenotypic.

Declaration of Interest

The authors declare no conflict of interest.

5. REFERENCES

- AGARWAL J., MISHRA B., SRIVASTAVA S., SRIVASTAVA R. (2013). **Genotypic characteristics and biofilm formation among *Escherichia coli* isolates from Indian women with acute cystitis.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 107: 183–187.
- AL-BAYSSARI, C., DABBOUSSI F, HAMZE M, ROLAIN JM. (2015). **Detection of expanded spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century.** *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* Early online, 1–20.
- ARLET, G., G. PHILIPPON. (1991). **Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamase (TEM, SHV, CARB) [corrected].** *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 19 – 25.
- BARIGYE, R., GAUTAM, A., PICHE, L. M., SCHAAN, L. P., KROGH, D. F., & OLET, S. (2012). **Prevalence and antimicrobial susceptibility of virulent and avirulent multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves.** *American journal of veterinary research*, 73(12), 1944-1950.
- BECEIRO, A; TOMÁS M; BOU G. (2013). **Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?** *Clinical Microbiology Reviews* April Vln 26 Number 2.
- BEDENIC', C. C., RANDEGGER, E., STOBBERINGH, H., HÄCHLER. (2001). **Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum b-Lactamases from *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated in Zagreb, Croatia.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20:505–508
- BLACKBURN D, HUSBAND A, SALDANA Z., NADA R.A., KLENA J., FIRDAUSI A, GIRON J.A. (2009). **Distribution of the *Escherichia coli* Common Pilus among Diverse Strains of Human Enterotoxigenic *E. coli* .** *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, June 2009, p. 1781–1784 Vol. 47, No. 6
- BRADFORD PA, BRATU S, URBAN C, VISALLI M, MARIANO N, LANDMAN D, et al. **Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the Class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York city.** *Clin Infect Dis* 2004; 39:55–60.
- BRAUN, V. and collaborates (2001). **Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria.** *Intl J Med Microbiol*, 291 pp. 67–79.
- P. S. CYOIA, G. R. RODRIGUES, E. K. NISHIO. (2015). **Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil.** *J Infect Dev Ctries*; 9(10):1068-1075.

CLERMONT, O., CHRISTENSON, J.K., DENAMUR, E., GORDON, D.M (2013). **The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.** *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 58-65.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2016). **Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters.** 4th ed. CLSI guideline M23. Wayne, PA: CLSI,

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

DERAKHSHANDEH A, FIROUZI R, MOTAMEDIFAR M, MOTAMEDI BOROOJENI A, BAHADORI M, ARABSHAHI S, NOVINROOZ A, HEIDARI S. (2015). **Distribution of virulence genes and multiple drug resistant patterns among different phylogenetic groups of Uropathogenic *E. coli* isolated from patients with urinary tract infection.** *Jpn. J. Infect. Dis.*, 68, 428–431.

DOZOIS CM, DHO-MOULIN M, BRÉE A, FAIRBROTHER JM, DESAUTELS C, CURTISS R (2000). **Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region.** *Infect Immun* 68: 4145-4154.

DUBOIS D, PRASADARAO NV, MITTAL R, BRET L, ROUJOU-GRIS M, BONNET R. (2009). **CTX-Mbeta-lactamase production and virulence of *Escherichia coli* K1.** *Emerg. Infect. Dis.* 15:1988–1990.

EJRNAES K, STEGGER M, REISNER A, FERRY S, MONSEN T, (2011b) **Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation.** *Virulence* 2: 528–537.

FOXMAN, B. (2010). **The epidemiology of urinary tract infection.** *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653-660.

JOHNSON, J. R., STELL, A. L (2000). **Extended Virulence Genotypes Of *Escherichia coli* Strains From Patients Urosepsis In Relation To Phylogeny And Host Compromise.** *J. Infect. Dis.* **181**, 261-272.

JOHNSON, T. J., WANNENUEHLER, Y., DOETKOTT, C., JOHNSON, S. J., ROSENBERGER, S. C., NOLAN, L.K (2008). **Identification Of Minimal Predictors Of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence For Use As A Rapid Diagnostic Tool.** *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3987-3996.

JOHNSON, T. J., SIEK, K. E., JOHNSON, S. J., & NOLAN, L. K. (2006). **DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains.** *Journal of bacteriology*, 188(2), 745-758.

KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. (2004). **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.

KOGA, V. L., TOMAZETTO, G., CYOIA, P. S., NEVES, M. S., VIDOTTO, M. C., NAKAZATO, G., & KOBAYASHI, R. K. (2014). **Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil.** *BioMed research international*, 2014.

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

KUMAR, N., NAHID, F., & ZAHRA, R. (2016). **Association of virulence factors, phylogenetic groups and antimicrobial resistance markers in *Escherichia coli* from Badin city, Pakistan.** *Journal of Chemotherapy*, 1-6.

LE BOUGUENEC, C., ARCHAMBAUD, M., LABIGNE, A. (1992). **Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction.** *Journal of clinical microbiology*, 30(5), 1189-1193.

LEE, J. H., SUBHADRA, B., SON, Y. J., KIM, D. H., PARK, H. S., KIM, J. M., CHOI, C. H. (2016). **Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea.** *Letters in applied microbiology*, 62(1), 84-90.

LLOYD, A. L., RASKO, D. A., & MOBLEY, H. L. (2007). **Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*.** *Journal of bacteriology*, 189(9), 3532-3546.

MASSOT, M., DAUBIÉ, A. S., CLERMONT, O., JAURÉGUY, F., COUFFIGNAL, C., DAHBI, G., EDDI, A. (2016). **Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years.** *Microbiology*, 162(4), 642-650.

MARRS CF, ZHANG L, TALLMAN P, MANNING SD. (2002). **Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*.** *J. Med. Microbiol.* 51: 138-142.

MARRS CF, ZHANG L AND FOXMAN B. (2005). ***Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?** FEMS Microbiol. Lett. 252: 183-190.

MARTINEZ-MEDINA, M., MORA, A., BLANCO, M., LÓPEZ, C., ALONSO, M. P., BONACORSI, S., BLANCO, J. (2009). **Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains.** *Journal of clinical microbiology*, 47(12), 3968-3979.

MELLATA, M., et al. (2013). **Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends.** Foodborne pathogens and disease, Volume 10, Number 11. 916- 932

MICENKOVÁ, L. BOSÁK J. VRBA M, ŠEVČÍKOVÁ A. ŠMAJS D. (2016). **Human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants.** BMC Microbiology 16:218

MITTAL, S., SHARMA, M., & CHAUDHARY, U. (2015). **Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*.** *Pathogens and global health*, 109(1), 26-29.

MORENO, E., G. PRATS, M. SABATE, T. PEREZ, J. R. JOHNSON., A. ANDREU. (2006). **Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*.** *J. Antimicrob.Chemother.* 57:204-211.

MULVEY, M. A. (2002). **Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*.** *Cellular microbiology*, 4(5), 257-271.

OLIVEIRA, F. A., PALUDO, K. S., AREND, L. N., FARAH, S. M., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M., FADEL-PICHETH, C. M. T. (2011). **Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains.** *Genet Mol Res*, 10(4), 4114-25.

PONNUSAMY. P, NATARAJAN. V, SEVANAN, M. (2012). **In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern.** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. p 210-213

SABATÉ, M., MORENO, E., PÉREZ, T., ANDREU, A., PRATS, G (2006). **Pathogenicity Island Markers In Commensal And Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates.** *Clin. Microb. Infect.* 12, 880-886.

SAHLY, H., NAVON-VENEZIA, S., ROESLER, L., HAY, A., CARMELI, Y., PODSCHUN, R., ... & OFEK, I. (2008). **Extended-spectrum β -lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(9), 3029-3034.

SAMEI, A., HAGHI, F., ZEIGHAMI, H. (2016). **Distribution of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates.** *Folia Microbiol* vol 61. P. 261–268

SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. **Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 48, n. 2, p. 91 – 99, abr. 2012.

SOTO, S. M., M. T. JIMENEZ DE ANTA., J. VILA. (2006). **Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or - independent pathways, respectively.** *Antimicrob.Agents Chemother.* 50:649-653.

SUBASHCHANDRABOSE. S, MOBLEY, H. (2015). **Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia*.** *Microbiol Spectr.* August ; 3(4)

SUKUMARAN, P., HATHA M. (2015). **Original Article Antibiotic resistance and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from tropical estuary, south India.** *J Infect Dev Ctries*; 9(5):496-504

WAKIMOTO, N., NISHI, J., SHEIKH, J., NATARO, J. P., SARANTUYA, J. A. V., IWASHITA, M., ... & KAWANO, Y. (2004). **Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71(5), 687-690.

WOODFORD, N., FAGAN, E. J., ELLINGTON M J. (2005). **Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum b-lactamases.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 154-155.

YAMAMOTO, S.; TERAII, A., YURI, K. (1995). **Detection of urovirulence factor in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction.** *FEMS Immunol. med. Microbiol.*, 12: 85-90,.

ZHAO, L., GAO, S., HUAN, H., XU, X., ZHU, X., YANG, W., LIU, X. (2009). **comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model.** *Microbiology*, 155(5), 1634-1644.

ZHANG, L., LEVY, K., TRUEBA, G., CEVALLOS, W., TROSTLE, J., FOXMAN, B., EISENBERG, J. N. (2015). **Effects of selection pressure and genetic association on the relationship between antibiotic resistance and virulence in *Escherichia coli*.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(11), 6733-6740.

ANEXOS:

Non-MDR UPEC

DNA	<i>iroN</i>	<i>hlyF</i>	<i>iutA</i>	<i>ompT</i>	<i>iss</i>	<i>tsh</i>	<i>ecpA</i>	<i>papC</i>	<i>papG</i>	<i>fyuA</i>	<i>HlyA</i>	<i>lbeA</i>	<i>KPSII</i>	<i>traT</i>	<i>cvaA</i>	<i>T</i>
1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	
5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	
9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	
11	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	
12	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	
15	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	
17	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	
18	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
19	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
20	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
21	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	
24	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
25	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	
26	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
28	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	
29	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	

30	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1
31	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
33	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
35	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
36	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
40	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
41	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
43	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
44	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
46	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
47	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
51	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
53	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
54	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
57	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
59	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
60	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
62	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
64	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
66	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
71	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
72	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
73	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
74	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
75	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0

76	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
77	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
79	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
91	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
98	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1

MDR UPEC

123	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	8	D	1	1	0	0	1	0	0	3	0	1	0	
124	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	7	B2	1	1	0	1	1	0	4	0	1	0	0	
126	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	C	1	0	0	0	1	1	0	3	0	1	1	
129	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	B1	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	
130	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	9	D	1	1	1	0	0	1	0	4	1	0	0	
134	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	9	B2	1	0	1	1	1	0	0	4	1	0	0	
135	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	C	1	1	1	0	1	0	0	4	0	1	0	
136	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	9	B2	1	1	1	1	1	0	0	5	0	0	0	
137	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	MLST	0	1	1	1	1	0	0	4	0	0	0	
138	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	B2	0	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0	
142	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	5	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
144	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	11	B2	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	

145	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	4	C	0	1	1	0	1	1	0	4	0	0	0
147	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
148	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	9	B2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
150	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	8	E	1	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	
151	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	B1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
152	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	D	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
154	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
155	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	D	1	0	1	0	1	0	0	3	0	1	0	
156	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	5	F	1	0	1	0	1	0	0	3	1	0	0	
157	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	4	F	1	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	
158	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	9	B1	1	0	1	0	1	0	0	3	0	0	0	
159	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	F	1	0	1	0	0	1	0	3	0	0	0	
162	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	6	B2	1	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	
163	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	4	B2	1	1	0	1	0	1	0	4	0	1	1	
164	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	6	B2	1	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	
165	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	4	B2	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	
166	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	6	E	0	1	1	0	1	0	0	3	0	0	0	
167	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	9	C	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	
168	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	4	B2	0	1	0	1	0	0	0	2	0	1	1	
170	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	5	C	1	1	0	0	1	1	0	4	0	0	0	

171-1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	B2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
172-1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	5	C	1	1	0	0	1	1	0	4	0	0	0
172-2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	6	E	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0
172-3	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	6	E	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	1
173	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	A	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
175	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	B1	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	1
176	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	12	B2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
178	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	D	0	1	0	0	1	0	0	2	1	0	0
181	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	6	B1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
182	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	B1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
186	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3	E	1	1	0	1	0	1	0	4	0	1	0
187	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	E	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
188	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	8	C	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
190	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	4	B2	1	0	0	1	1	0	0	3	1	0	0
193	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	4	B2	1	1	0	1	0	0	0	3	0	0	0
194	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	4	F	1	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0
195	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	9	D	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0
196	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	7	D	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0

COMMENSAL

1.1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	C	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2.2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	6	A	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0

