



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALESSANDRA VALÉRIO NIMTZ

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE FATORES DE
VIRULÊNCIA, TIPAGEM MOLECULAR E GRUPOS
FILOGENÉTICOS DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
ISOLADAS DE CRIANÇAS COM BEXIGA NEUROGÊNICA EM
LONDRINA – PR**

Londrina
2008

ALESSANDRA VALÉRIO NIMTZ

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE FATORES DE
VIRULÊNCIA, TIPAGEM MOLECULAR E GRUPOS
FILOGENÉTICOS DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
ISOLADAS DE CRIANÇAS COM BEXIGA NEUROGÊNICA EM
LONDRINA – PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis

Londrina
2008

ALESSANDRA VALÉRIO NIMTZ

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE FATORES DE
VIRULÊNCIA, TIPAGEM MOLECULAR E GRUPOS
FILOGENÉTICOS DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
ISOLADAS DE CRIANÇAS COM BEXIGA NEUROGÊNICA EM
LONDRINA – PR**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis

Londrina, 29 de abril de 2008.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais, por todo amor, apoio e incentivo e também por todas as oportunidades oferecidas. Amo vocês por isso e muito mais!

À minha querida orientadora, Prof.^a Dr.^a Halha Ostrensky Saridakis, a quem tenho muita admiração e um carinho enorme. Por ter ensinado tudo que aprendi nesses cinco anos de laboratório, por ser essa pessoa especial e amiga e pela confiança que depositou em mim. Ficará para sempre comigo!

À Prof.^a Dr.^a Marilda Carlos Vidotto, por aceitar o convite para participar da banca e por ceder parte do material utilizado nesta dissertação.

Ao professor Dr. Tomomasa Yano, por participar da banca examinadora mesmo com toda a distância.

À Prof.^a Dr.^a Jacinta Sanchez Pelayo, pelas dúvidas esclarecidas, por todos os almoços juntas, pela amizade e por tantas risadas proporcionadas.

À Prof.^a Dr.^a Renata Katsuko Takayama Kobayashi, uma pessoa de quem gosto muito, pela paciência, pelo esclarecimento de dúvidas, pela imensa ajuda e pela amizade e simpatia.

Aos atuais e ex-companheiros de laboratório, que fizeram com que estes anos todos fossem tão divertidos: Raquel Girardello, Paula I. P. L. Barbosa, Kathelin Lascowiski, Carlos Alfredo S. Queiroz, Rafael O. Melo, Sílvia Cestari, Michele Siewert, Claci Sandra, Ilmara Varotto, Eliana Vespero, Cláudia Ross, Bárbara Moriel e André Lengert.

À Tatiane Yumi, Eduardo Feniman e Rafael Penha pela ajuda direta neste trabalho, mas principalmente pela amizade e diversão.

À companheira de laboratório e amiga especial Karen de Castro Bauab, pela ajuda, apoio, conforto, amizade e por tantos momentos prazerosos.

À Galleger Ilhe pelas inúmeras impressões de artigos, pela ajuda oferecida, por tantas palavras de conforto nas horas em que tive medo, por conseguir me acalmar e por ser uma pessoa especial.

Aos amigos que agora estão distante, mas que percorreram todo o caminho comigo e que torcem por mim: Ana Carolina M. Zidko, Bruno C. C. Passos, Eder Ayres, Fernanda Shimabukuro, Rafael Ferraz, Sabrina Lisboa e Wagner Florindo. Vocês são muito especiais em minha vida.

Enfim, a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho meu muitíssimo obrigada!

NIMTZ, Alessandra Valério. **caracterização genotípica de fatores de virulência, tipagem molecular e grupos filogenéticos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de crianças com bexiga neurogênica em Londrina – PR**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A bexiga neurogênica pode ocorrer como conseqüência de diferentes fatores, como doenças, traumas, causas congênitas, que afetam o funcionamento normal deste órgão. Infecção do trato urinário (ITU) é a complicação mais freqüentemente encontrada nos pacientes portadores de tal condição, sendo *Escherichia coli* o microrganismo mais comumente isolado de tal infecção. Neste estudo, cepas de *E. coli* isoladas de urina e regiões periuretral e perianal de 16 crianças portadoras de bexiga neurogênica foram analisadas quanto a presença de genes codificantes para alguns fatores de virulência relacionados a UPEC (*E. coli* uropatogênica) utilizando a técnica de PCR. Os fatores de virulência estudados foram fímbria tipo 1 (*fimH*), fímbria P (*papC* e *papG*), hemaglutinina termo-sensível (*tsh*), receptor de yersiniabactina (*fyuA*), receptor de aerobactina (*iutA*), plasmídeo ColV (*cvaC*), resistência aumentada ao soro (*iss*), hemolisina (*hlyA*) e fator citotóxico necrotizante (*cnf1*). As cepas foram classificadas em grupos filogenéticos de acordo com técnica descrita por Clermont e colaboradores (2000) e suas similaridades genéticas foram analisadas utilizando a técnica de BOX-PCR. Foram encontradas altas freqüências de *fimH* (100%), *fyuA* (95,6%) e *iutA* (91,3%) entre os isolados. *cnf1*, *iss* e *hlyA* estiveram presentes em 56,5%, 39,1% e 36,2% das cepas, respectivamente. Outros genes estudados foram encontrados em menos de 30% das cepas. A maioria dos isolados foram classificados como pertencentes aos grupos filogenéticos patogênicos B2 e D (37,7% e 30,4%, respectivamente). BOX-PCR confirmou a hipótese de origem intestinal das cepas de *E. coli* causadoras de infecções do trato urinário, e demonstrou a importância da colonização da periuretra por estes microrganismos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Genética. Bexiga neurogênica.

NIMTZ, Alessandra Valério. **caracterização genotípica de fatores de virulência, tipagem molecular e grupos filogenéticos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de crianças com bexiga neurogênica em Londrina – PR**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Neurogenic bladder occurs as consequence of different events that affect the normal function of the organ. Urinary tract infection (UTI) is the most frequent complication found in patients with such alteration, and *Escherichia coli* is the most commonly microorganism isolated from this infection. In this study, *E. coli* strains isolated from urine and periurethral and perianal regions of 16 children with neurogenic bladder were analyzed for the presence of genes coding for some virulence factors related to UPEC (uropathogenic *E. coli*) using PCR technique. Virulence factors studied were type 1 fimbriae (*fimH*), P fimbriae (*papC* and *papG*), temperature-sensitive hemagglutinin (*tsh*), yersiniabactin receptor (*fyuA*), aerobactin receptor (*iutA*), ColV plasmid (*cvaC*), increased serum survival (*iss*), hemolysin (*hlyA*) and cytotoxic necrotizing factor (*cnf1*). Strains were assigned into phylogenetic groups according to Clermont et al. (2000) and their genetic similarities were analyzed using BOX-PCR technique. We found a high frequency of *fimH* (100%), *fyuA* (95,6%) and *iutA* (91,3%) among the isolates. *cnf1*, *iss* and *hlyA* were present in 56,5%, 39,1% and 36,2% of the strains, respectively. The other studied genes occurred in less than 30% of the strains. Most of the isolates were classified as belonging to pathogenic groups B2 and D (37,7% and 30,4%, respectively). BOX-PCR confirmed the hypothesis of intestinal origin of *E. coli* strains causing urinary tract infections, and demonstrated the importance of periurethral colonization by these microorganisms.

Keywords: *Escherichia coli*. Genetics. Neurogenic bladder.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1 BEXIGA NEUROGÊNICA	10
2 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	11
3 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO	12
4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> RELACIONADOS À INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO	14
4.1 ADESINAS	15
4.2 SIDERÓFOROS	22
4.3 RESISTÊNCIA SÉRICA	25
4.4 TOXINAS	26
5 GRUPOS FILOGENÉTICOS	31
REFERÊNCIAS	33
OBJETIVOS	41
OBJETIVO GERAL	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
ARTIGO	42

INTRODUÇÃO

Bexiga neurogênica é uma condição em que a função normal da bexiga é perdida devido a uma lesão de parte do sistema nervoso. A bexiga neurogênica pode ser decorrente alguma doença, de um trauma ou de um defeito congênito que afeta o cérebro, a medula espinhal ou os nervos que se dirigem à bexiga, seu esfíncter ou a ambos. A bexiga neurogênica pode ser hiperativa (espástica), esvaziando por reflexos incontrolláveis, ou hipoativa, isto é, não contrátil e incapaz de esvaziar adequadamente, geralmente decorrente da interrupção dos nervos que a inervam. Nas crianças a causa mais comum é um defeito congênito da medula espinhal como, por exemplo, a espinha bífida ou a mielomeningocele.

Tais pacientes devem ser submetidos à cateterização a cada 4 horas, aproximadamente, para que ocorra o esvaziamento da bexiga. As infecções são comuns nestes pacientes, pois o acúmulo de urina residual na bexiga cria condições que estimulam o crescimento bacteriano.

O agente etiológico mais implicado em infecções do trato urinário é *Escherichia coli*, um bacilo Gram-negativo que faz parte da microbiota normal do intestino humano e de outros animais de sangue quente e é responsável por cerca de 80% das infecções urinárias comunitárias.

As infecções do trato urinário são, geralmente, ascendentes, ou seja, a bactéria primeiramente coloniza a uretra e depois atinge a bexiga, podendo então atingir o rim causando pielonefrite, uma condição séria que pode levar à bacteremia e perda de função renal.

Para causar infecção, *Escherichia coli* deve possuir alguns fatores que favoreçam sua permanência e multiplicação na bexiga. Tais fatores são conhecidos como fatores de virulência e incluem adesinas, capacidade de invasão das células uroepiteliais, produção de toxinas e sideróforos.

As cepas de *E. coli* consideradas uropatogênicas podem ser agrupadas no grupo filogenético B2 e em menor extensão no grupo D, classificação baseada nos fatores de virulência albergados pelas cepas.

O objetivo do trabalho foi estudar cepas de *Escherichia coli* isoladas de crianças com bexiga neurogênica, avaliar a presença de determinantes genéticos para diferentes fatores de virulência pela técnica de PCR, assim como a classificação das cepas nos diferentes grupos filogenéticos.

Também foi realizada a técnica de BOX-PCR, para avaliar a similaridade genética entre cepas isoladas de um mesmo paciente, com a finalidade de esclarecer a provável fonte de infecção.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 BEXIGA NEUROGÊNICA

Bexiga neurogênica ocorre como seqüela de várias doenças ou eventos que afetam o sistema nervoso responsável pelo controle do trato urinário. Pode ser decorrente de defeitos congênitos, traumas, doenças ou lesões neurológicas periféricas. A disfunção resultante depende da localização e extensão da lesão neurológica. Tanto na bexiga neurogênica congênita quanto na adquirida, diagnóstico precoce e tratamento são essenciais para a prevenção de danos renais irreversíveis (GUIDONI et al., 2006).

Pacientes portadores de tal condição freqüentemente são submetidos a sondagem, para o esvaziamento adequado da bexiga. A cateterização intermitente é considerada um método seguro e efetivo para o controle desta disfunção, melhorando o tempo e a qualidade de vida dos pacientes. Entretanto, a bacteriúria é freqüente, sendo encontrada em aproximadamente 70% dos pacientes (SCHLAGER et al., 2000).

Supõe-se que a bacteriúria assintomática seja conseqüência dos mecanismos de defesa do hospedeiro capazes de controlar a infecção ou de uma condição primária em que bactérias de baixo potencial de virulência colonizam o trato urinário sem causar uma resposta sintomática (HOOTON, 2000).

Essa alta freqüência de bacteriúria parece relacionada às bactérias que colonizam a região periuretral, e que são inoculadas diariamente na bexiga das crianças submetidas à sondagem. Schlager e colaboradores (1995) identificaram colonização bacteriana na periuretra de crianças com bexiga neurogênica que produziram bacteriúria, durante um estudo longitudinal. Quando *E.coli* foi detectada na periuretra, bacteriúria pela mesma bactéria ocorreu em 93% dos casos.

De acordo com Guidoni e colaboradores (2006), bacteriúria assintomática e sua possível associação a danos renais são os maiores problemas enfrentados nestas crianças. Infecção do trato urinário (ITU) é a complicação mais

comum entre pacientes portadores de bexiga neurogênica (WAITES et al., 2006), acarretando grande morbimortalidade e podendo levar à condição de insuficiência renal crônica e necessidade de terapia de substituição renal.

Escherichia coli é o microrganismo mais freqüentemente responsabilizado por bacteriúria, podendo persistir na periúretra e/ou na urina por semanas ou meses sem causar doença sintomática (SCHLAGER et al., 2000). Ocasionalmente, entretanto, pode causar ITU sintomática (GUIDONI et al., 2006).

2 ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não formador de esporos, geralmente móvel pela presença de flagelos peritríquios e pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo componente da microbiota normal intestinal de humanos e maioria de animais de sangue quente.

Em termos de significância para humanos, *E. coli* são agrupadas em três categorias: cepas comensais, que representam grande parte da microbiota intestinal normal, cepas patogênicas intestinais, causadoras de diarreias (também conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas) e aquelas responsáveis por infecções extraintestinais (ExPEC) (MAYNARD et al, 2004, DURANT et al., 2007). De acordo com Durant e colaboradores (2007), ExPEC podem ser encontradas na microbiota intestinal normal, atingindo 11% dos isolados de indivíduos saudáveis e tais cepas apresentam a capacidade de colonizar sítios extraintestinais e causar infecção em diversos órgãos em humanos, estando envolvidas principalmente em septicemias, meningites e infecções do trato urinário.

Escherichia coli é o patógeno mais comumente isolado de infecções do trato urinário (EMÖDY et al., 2003; JOHNSON and STELL, 2000; BONACORSI et al., 2006; MYSOREKAR and HULTGREN, 2006; SOTO et al., 2006), e freqüentemente é originário da microbiota intestinal normal do próprio paciente. Segundo Mysorekar e Hultgren (2006), mais de 80% das infecções do trato urinário são causadas por *E. coli*.

3 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

Infecções do trato urinário (ITU) estão entre as infecções bacterianas mais comuns, causando significativa morbidade e mortalidade e gerando altos custos ao sistema de saúde pública (RIPPERE-LAMPE et al., 2001; JUSTICE et al., 2004; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005; DAVIS et al., 2006).

Ocorrem com maior frequência em indivíduos do sexo feminino, devido à proximidade entre o ânus e a abertura da uretra e à facilidade de colonização da vagina (HOOTON, 2000; OBATA-YASUOKA et al., 2002).

O trato gastrointestinal é comumente a via de infecção endógena em peritonites, apendicites e infecções urinárias (MINSHEW et al., 1978; YAMAMOTO, 2007), enquanto o trato urinário é a fonte mais comum de bacteremia, fato que sugere que o patógeno infectante interage e invade a circulação sangüínea através do epitélio renal (TRIFILLIS et al., 1994).

Infecções do trato urinário são classificadas de acordo com o sítio de infecção: cistite (bexiga), pielonefrite (rim) e bacteriúria (urina). A colonização da urina sem a presença de sintomas clínicos é denominada bacteriúria assintomática (ROOS et al., 2006).

Segundo Yamamoto (2007), infecções do trato urinário geralmente são ascendentes e normalmente ocorrem como consequência da colonização da região periuretral pelo microrganismo, que então ganha acesso à bexiga, causando bacteriúria ou ITU sintomática. Seu estudo demonstrou que cepas de *E. coli* isoladas de infecções do trato urinário apresentaram os mesmos genótipos e sorotipos que *E. coli* da microbiota intestinal e que essas foram consideradas geneticamente idênticas quando submetidas à técnica de PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), indicando que o intestino é reservatório de *E. coli* para ITU.

Entretanto, não há um consenso quanto à fonte de cepas urovirulentas que habitam o cólon. Uma rota plausível de transmissão para qualquer bactéria que coloniza o trato intestinal é a fecal-oral. Autores têm sugerido que aves constituem veículos candidatos, já que APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*) e UPEC

(uropathogenic *Escherichia coli*) apresentam grandes similaridades quanto a sorogrupos, perfis genéticos de fatores de virulência e distribuição nos grupos filogenéticos (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005; SKYBERG et al., 2006).

Uma vez na bexiga, o microrganismo pode invadir células epiteliais que, em resposta, sofrem um processo semelhante a apoptose e são esfoliadas, liberando bactérias na urina. Estudos demonstram que *E. coli* é capaz de persistir intracelularmente por meses, em modelos experimentais de infecção em ratos, em uma forma quiescente, que pode servir de reservatório para infecções recorrentes (JUSTICE et al., 2004; MYSOREKAR et al., 2006).

Infecções sintomáticas do trato urinário ocorrem quando uropatógenos presentes na bexiga ou nos rins estimulam liberação de citocinas, resultando em resposta inflamatória e aparecimento de sintomas (HOOTON, 2000). Complicações em longo prazo de ITU são raras, no entanto, uma infecção ascendente do trato urinário pode resultar em pielonefrite (LE BOUGUENEC et al., 1992; DAVIS et al., 2005), que é a complicação mais séria, podendo levar à septicemia (DAVIS et al., 2005) e insuficiência renal crônica e conseqüente necessidade de tratamento dialítico.

Já em 1988, Johnson e colaboradores observaram que cepas de *Escherichia coli* que causam infecções no trato urinário em pacientes sem anormalidades urológicas tipicamente possuem fatores de virulência específicos, em contraste com pacientes que apresentam condições urológicas predisponentes, nos quais infecções do trato urinário são freqüentemente causadas por cepas que não possuem tais fatores (JOHNSON e STELL, 2000).

Segundo Hooton (2000), fatores mecânicos ou fisiológicos que afetam o esvaziamento da bexiga estão fortemente associados a infecções recorrentes. O esvaziamento inadequado da bexiga provoca um acúmulo de urina residual, que provê meio contínuo para o crescimento bacteriano. Esta condição é encontrada em pacientes com bexiga neurogênica e, segundo Schlager e colaboradores (2000), permite que *E. coli* sem determinantes de virulência cause ITU (SCHLAGER et al., 2000).

4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* RELACIONADOS À INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

Virulência é definida como a habilidade de um organismo causar doença em um hospedeiro (JOHNSON, 1991). Fatores de virulência são características que proporcionam vantagens aos microrganismos quanto à sobrevivência no hospedeiro além de lhes conferir potencial patogênico. Segundo Emödy e colaboradores (2003), fatores de virulência capacitam *E. coli* a colonizar seletivamente a mucosa uroepitelial, induzir reação inflamatória e eventualmente migrar para outros tecidos.

Fatores de virulência conhecidos incluem diversas adesinas, toxinas, sideróforos, cápsula e invasinas, os quais facilitam colonização e invasão do hospedeiro, evasão dos mecanismos de defesa, injúrias teciduais e/ou estimulação de resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro (JOHNSON and STELL, 2000; JOHNSON et al., 2001; YAMAMOTO, 2007).

Tais fatores em *E. coli* estão mais presentes em cepas isoladas de infecções do que entre *E. coli* residentes na microbiota normal do hospedeiro (MINSHEW et al., 1978; HULL et al., 1998; JOHNSON e STELL, 2000; SABATÉ et al., 2006). Segundo Schlager e colaboradores (2000), clones de *E. coli* isolados de mulheres com trato urinário normal e pielonefrite expressam com maior frequência aerobactina, hemolisina, adesinas e resistência ao soro do que clones isolados de mulheres com cistite ou bacteriúria assintomática ou de amostras fecais.

Cepas isoladas do trato urinário comumente expressam múltiplos fatores de virulência simultaneamente. A habilidade de ExPEC de acumular e expressar múltiplos determinantes associados à virulência aumenta sua aptidão e determina seu potencial de causar doença (BIELASZEWSKA et al., 2007).

Em algumas cepas essa expressão múltipla é consequência da presença de blocos de determinantes genéticos interligados que codificam para diversos fatores de virulência (JOHNSON, 1991; BINGEN-BIDOIS, 2002), conhecidos como ilhas de patogenicidade.

Ilhas de patogenicidade (PAIs) são elementos genéticos flexíveis que codificam para diversos fatores de virulência, como adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro e cápsula. São regiões de DNA móveis, contendo de 10 a 200 kb, freqüentemente localizadas adjacentes a genes de RNA transportador. PAIs são instáveis, flanqueadas por seqüências repetitivas e diferem das demais regiões cromossomais por sua concentração de G+C, o que indica que estas frações de DNA foram adquiridas de outro microrganismo (OELSCHLAEGER et al., 2002; EMÖDY et al., 2003; SCHMIDT e HENSEL, 2004; SABATÉ et al., 2006).

A identificação de fatores de virulência deve contribuir para diagnósticos e dados epidemiológicos mais precisos (EMÖDY et al., 2003). Como o comprometimento do hospedeiro pode diminuir a importância patogênica de certos fatores de virulência, também se faz importante a identificação de fatores de virulência que permanecem prevalentes entre hospedeiros comprometidos (JOHNSON and STELL, 2000).

4.1 ADESINAS

Adesinas podem ser subdivididas em duas categorias: fimbriais e afimbriais, sendo, ambas, responsáveis por aderência a diferentes tecidos do hospedeiro.

As propriedades de aderência de *E. coli* foram primeiramente reconhecidas através da técnica de aglutinação de eritrócitos na presença de cepas bacterianas, e esta técnica permite a distinção das fímbrias hemaglutinantes em dois tipos: fímbria manose-sensível (tipo 1), cuja atividade hemaglutinante é inibida em presença de D-manose; fímbrias manose-resistentes, que reconhecem carboidratos presentes nos receptores de células eucarióticas, diferentes da D-manose e, portanto, não têm suas atividades hemaglutinantes inibidas pela D-manose.

Uma das principais defesas do trato urinário do hospedeiro é a ação de lavagem da urina. Portanto, para causar infecção as bactérias devem ser capazes de

se dividir rapidamente para se manter em número suficiente na bexiga ou aderir ao epitélio (SALYERS e WHITT, 2001). A adesão é considerada o primeiro passo necessário para colonização do tecido do hospedeiro, podendo levar a uma possível infecção. Porém Roos e colaboradores (2006) estudaram a capacidade de colonização da cepa de *E. coli* 83972 frente a cepas de UPEC isoladas de ITU. A cepa 83972 foi isolada de uma jovem, portadora de bacteriúria assintomática, que a carregou por 3 anos. Esta cepa possui determinantes não funcionais para fímbria P e fímbria tipo 1 e não adere a qualquer tipo celular presente no trato urinário, o que explica a ausência de resposta inflamatória do hospedeiro. Porém, experimentos de coincubação da cepa, juntamente com cepas isoladas de ITU, em urina humana e modelos experimentais em ratos, demonstraram que *E. coli* 83972 é capaz de superar o crescimento de cepas de UPEC, tornando-se predominante em cultura e infecção experimental, demonstrando sua capacidade de causar bacteriúria sem aderir ao epitélio.

Cepas de UPEC comumente expressam múltiplas adesinas e podem apresentar combinações de diferentes fímbrias ou combinações de diferentes sorotipos da mesma adesina em suas superfícies, o que pode contribuir para que a bactéria ludibrie o sistema imune do hospedeiro. Essa multiplicidade de adesinas, necessária para o reconhecimento de vários receptores ao longo do trato urinário, parece ser um importante fator no desenvolvimento de infecções do trato urinário e no aumento da patogenicidade de cepas de *E. coli* (LE BOUGUENEC et al., 1992).

Dentre as adesinas fimbriais, as mais comumente associadas a ITU são fímbria tipo 1 e fímbria P, sendo a primeira manose-sensível e a segunda manose-resistente.

Fímbria tipo 1 reconhece resíduos de manose naturalmente presentes em glicoproteínas da superfície da célula hospedeira, e parece estar envolvida com processos de adesão, invasão e formação de biofilme (OELSCHLAEGGER, et al., 2002; EMÖDY et al., 2003). Receptores para fímbria tipo 1 estão presentes em eritrócitos de muitas espécies, células epiteliais bucais, vaginais e uroepiteliais (JOHNSON, 1991).

A fímbria tipo 1 foi reconhecida como sendo capaz de induzir internalização. É o fator de virulência mais freqüentemente expresso por UPEC, embora seja comumente encontrado também entre cepas não-UPEC, inclusive fecais

(JOHNSON, 1991; YAMAMOTO, 2007), fazendo com que a ação da fímbria tipo 1 como fator de virulência tenha sido questionada. Porém, sabe-se que esta fímbria presente na superfície bacteriana reconhece proteínas manossiladas na superfície celular do epitélio da bexiga de ratos (JUSTICE et al., 2004), levando à ligação e invasão das células epiteliais (MYSOREKAR e HULTGREN, 2006).

Segundo Johnson (1991), fímbria tipo 1 promove aderência a leucócitos polimorfonucleares e fagocitose. Algumas cepas não são fagocitadas e promovem a degranulação de leucócitos polimorfonucleares como consequência da ligação bacteriana, o que, em casos de pielonefrite, pode levar a cicatrizes renais (HOLDEN et al., 2006).

A produção da fímbria é codificada por um cluster que inclui genes para a subunidade estrutural, uma adesina, várias proteínas acessórias e regulatórias. Isolados clínicos tipicamente possuem uma única cópia do cluster para fímbria tipo 1 (JOHNSON, 1991).

A expressão da fímbria tipo 1 é regulada em nível transcricional por um promotor situado em um elemento invertível, que pode se apresentar em duas orientações. A orientação que permite a transcrição gênica é denominada “on”, e a posição contrária, na qual não ocorre transcrição, é denominada “off”. O elemento invertível é controlado por duas recombinases: FimB, que promove inversão nas duas direções, e FimE, que promove inversão de “on” para “off” (GUNTHER IV et al., 2002; HOLDEN e GALLY, 2004; SNYDER et al., 2006).

Adesinas bacterianas são antigênicas, portanto, a expressão de muitas adesinas fase variáveis, reflete um balanço entre a capacidade de aderir e a de ludibriar o sistema imune do hospedeiro (HOLDEN and GALLY, 2004).

Segundo Snyder e colaboradores (2006), isolados de *E. coli* de pacientes com cistite ou pielonefrite possuem padrões diferentes quanto à variação de fase em tempos específicos durante ITU.

Gunther IV e colaboradores (2002) e Snyder e colaboradores (2006), estudaram a influência da inversão de fase da fímbria tipo 1 em CFT073, cepa isolada de pielonefrite, e F11, cepa isolada de cistite, respectivamente, para avaliar o papel da fímbria tipo 1 em ITU. Para tanto, foram produzidos 2 mutantes de cada uma das duas

cepas, bloqueados na orientação “on” ou na orientação “off”. Tanto os mutantes quanto as cepas selvagens foram testadas em um modelo de infecção ascendente do trato urinário em ratos. Os resultados encontrados demonstraram que a ausência de fímbria tipo 1 teve profundos efeitos na colonização da bexiga e que a expressão de fímbria tipo 1 é mais requerida em estágios iniciais de infecção por cepas causadoras de pielonefrite.

Cepas causadoras de cistite apresentam o elemento invertível na orientação “on”, onde permanece, enquanto cepas de pielonefrite se apresentam na orientação “on” no início da infecção e tendem a inverter para “off” (OELSCHLAEGER et al., 2002; YAMAMOTO, 2007).

Alguns estudos demonstraram um mecanismo de regulação entre fímbria tipo 1 e fímbria P. PapB, uma proteína regulatória da expressão de fímbria P, diminui a expressão do gene que codifica para a subunidade estrutural da fímbria tipo 1. Essa regulação é devida à inibição da recombinação do promotor de *fim* por FimB e aumento da expressão de FimE (HOLDEN and GALLY, 2004; HOLDEN et al., 2006).

Essa regulação é demonstrada pelos fatos de que, na ausência de fímbria P, a fímbria tipo 1 contribui para a colonização do trato urinário superior e quanto maior a expressão de fímbria P, menor a expressão de fímbria tipo 1 (JOHNSON, 1991; HOLDEN et al., 2006).

A regulação apropriada das adesinas é necessária durante a infecção para otimizar a colonização e prevenir a eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro. Este sistema previne a coexpressão de certas adesinas e permite a expressão seqüencial para a consolidação da colonização (HOLDEN e GALLY, 2004).

Fímbria P é a adesina mais reconhecidamente implicada na patogênese de infecções do trato urinário superior, estando presente em cerca de 80% dos isolados de *E. coli* de pacientes com pielonefrite (HOOTON, 2000; YAMAMOTO, 2007). Medeia uma ligação específica com receptores Gal(α 1-4)Gal (digalactose), expressos em eritrócitos humanos do grupo P e também ao longo de todo o trato urinário humano (JOHNSON et al., 1998; EMÖDY et al, 2003), facilitando infecção ascendente e estimulando reação inflamatória do hospedeiro (JOHNSON et al., 2000).

De acordo com Johnson (1991), glicolipídios contendo Gal-Gal compreendem pequena parte dos glicolipídios de células uroepiteliais, porém são predominantes em células renais humanas, principalmente em células epiteliais do túbulo proximal. A abundância de receptores para fímbria P no tecido renal humano, a importância da fímbria P na colonização do trato urinário superior em ratos e a associação de fímbria P com pielonefrite aguda em humanos sugere que fímbria P é requerida para colonização e invasão do trato urinário superior humano. Porém sabe-se que fímbria P também se liga a células epiteliais e musculares da bexiga e, na ausência de fímbria tipo 1, é responsável pela colonização deste órgão.

Fímbria P é composta por subunidades polimerizadas helicoidalmente, sendo que PapA é a subunidade estrutural. Três subunidades relacionadas à aderência (PapE, PapF e PapG) estão presentes em pequenas quantidades na extremidade fimbrial, sendo que PapG é a molécula aderente responsável pela especificidade Gal-Gal. PapC, PapD e PapH são proteínas de processamento e montagem, enquanto PapB e PapI são proteínas regulatórias. As proteínas fimbriais, assim como as acessórias, são codificadas por um cluster gênico cromossomal denominado *pap* (JOHNSON, 1991; SALYERS e WHITT, 2001).

A expressão do cluster *pap* também é controlada por variação de fase, apresentando um mecanismo mais complexo do que aquele apresentado pela fímbria tipo 1. O promotor de PapA está situado entre as regiões codificadoras das proteínas regulatórias PapI e PapB, cujas expressões por promotores divergentes dependem do estado de metilação de dois sítios (GATC) pela enzima desoxiadenosina metilase (Dam). A variação de fase é determinada pela formação de complexos protéicos alternativos que ativam ou suprimem a transcrição dos genes *pap*. A formação de cada complexo protege um único sítio da ação de Dam. O estado de metilação dos sítios determina se a ligação de ativadores críticos ocorre e, então, se a região está na configuração “on” ou “off”. (BLOMFIELD, 2001; HOLDEN e GALLY, 2004).

PapG ocorre em três variantes moleculares (classes I, II e III) que são codificadas por alelos distintos do gene *papG*. As diferentes especificidades de receptores das três variantes de PapG provavelmente confere diferenças no espectro de células hospedeiras ou capacidade de causar diferentes sintomas clínicos, sendo

que *papG* classe II parece estar mais relacionado com cepas causadoras de pielonefrite, enquanto *papG* classe III está mais relacionado com infecções na bexiga (JOHNSON et al., 1998).

Fímbria P ocorre em diversas variantes sorológicas, classificadas em F7-1, F7-2 e F8 a F16. Essa diversidade antigênica é atribuída à variabilidade de seqüência peptídica dentro de PapA. Cepas de *E. coli* podem conter mais de três cópias do operon *pap* e, já que cada operon *pap* pode conter um alelo diferente de *papA*, podem expressar mais de três tipos antigênicos de fímbria P (JOHNSON et al., 2000).

O fato de cepas de *E. coli* podem apresentar mais que um determinante para fímbria P foi confirmado por Holden e colaboradores (2006) que, utilizando a técnica de Southern blotting, demonstraram a presença de duas ou mais cópias do cluster *pap* em cepas de *E. coli* isoladas de pielonefrite e cistite. No teste de hemaglutinação em presença de manose, algumas cepas isoladas de bacteriúria assintomática não demonstraram uma hemaglutinação clara, o que sugere que nestas a expressão de fímbria P é reprimida ou que mutações no operon impediram a expressão. Essa diminuição de expressão é acompanhada pela falta de reação inflamatória, o que é consistente com o estado assintomático dos pacientes.

Uma proteína, descrita pela primeira vez em cepas de APEC, Tsh, tem demonstrado ser uma proteína bifuncional, apresentando propriedades proteolíticas e também de aderência.

A proteína Tsh é uma hemaglutinina temperatura sensível responsável por uma hemaglutinação manose resistente. É uma proteína de autotransporte, capaz de um mecanismo autônomo para exportar seu domínio ativo através da membrana externa (STATHOPOULOS et al., 1999, RESTIERI et al., 2007), pelo sistema de secreção tipo V, que não requer gasto energético e nem proteínas adicionais durante o processo de translocação.

Segundo Kostakioti e Stathopoulos (2004), proteínas de autotransporte são fatores de virulência, pois seus domínios passageiros podem atuar como adesinas, proteases, hemaglutininas, toxinas ou mediadoras de motilidade intracelular.

A proteína é codificada pelo gene *tsh*, caracterizado em *E. coli* de origem aviária e localizado em plasmídeo. Apresenta homologia às serinoproteases de IgA de *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, porém não clivam IgA e é membro do grupo da serina protease autotransporte de *Enterobacteriaceae* (SPATE). Tsh é sintetizada como uma proteína precursora de 140kDa, que sofre processos proteolíticos resultando em ao menos 2 proteínas, sendo uma de 33kDa que se insere na membrana externa e medeia a translocação do domínio secretado de 106kDa (STATHOPOULOS et al., 1999), apresentando atividade proteolítica e de aderência (KOSTAKIOTI and STATHOPOULOS, 2004).

A presença do gene *tsh* foi verificada por Heimer e colaboradores (2004) que, analisando cepas de *E. coli* humanas de pielonefrite, cistite e fecais, encontraram *tsh* em 61%, 65% e 33% das cepas, respectivamente; enquanto Rodriguez-Siek e colaboradores (2005) encontraram o gene *tsh* em 39,5% de UPEC, dados que demonstram que este gene faz parte do conjunto de genes de virulência presentes em ExPEC.

Kostakioski e Stathopoulos (2004) demonstraram que a proteína Tsh é capaz de se ligar a eritrócitos de carneiro, hemoglobina aviária, colágeno IV e fibronectina, porém não houve ligação significativa com mucina, que é uma glicoproteína presente no muco epitelial de diversos sistemas e possui papel fundamental na lubrificação e proteção do hospedeiro.

O muco é uma secreção viscosa que cobre muitas superfícies epiteliais, sendo encontrado também na bexiga. A degradação completa ou parcial das moléculas de mucina por enzimas bacterianas é freqüentemente um passo fundamental na transgressão das barreiras defensivas impostas pela mucosa. Ainda não está claro o papel real da proteína Tsh na degradação da mucina no processo infeccioso.

Kobayashi e colaboradores (2007) usaram preparações de mucina gástrica de porco, submaxilar de bovinos e traqueal de aves como substrato para testar a atividade mucinolítica da proteína. A ação mucinolítica foi detectada nos três tipos de muco, sendo inibida por anticorpos anti-Tsh.

No entanto o papel desta adesina em infecção do trato urinário ainda não está elucidado.

4.2 SIDERÓFOROS

O ferro é indispensável para o metabolismo celular bem como um fator importante para o crescimento de bactérias patogênicas. *E. coli* utiliza o ferro para o transporte de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos. No hospedeiro, o ferro é encontrado predominantemente associado a proteínas, estando uma quantidade muito baixa de ferro livre disponível. Portanto, bactérias desenvolveram várias estratégias para captação e armazenamento deste elemento presente no hospedeiro, tais como produção de receptores de sideróforos e sistemas de captação de ferro envolvendo proteínas que liberam ferro de complexos encontrados no hospedeiro (BEARDEN et al., 1998; PERRY et al., 1999; DURANT et al., 2007).

Segundo Perry e colaboradores (1999), sideróforos são estruturas de baixo peso molecular com alta afinidade por ferro secretadas no meio, onde ligam-se a ferro precipitado ou retiram ferro de proteínas do hospedeiro. A entrada do complexo ferro-sideróforo fornece à célula o ferro necessário para o crescimento. Em *E. coli*, o sideróforo aerobactina é o mais efetivo dos vários sistemas de quelação empregados por bactérias entéricas para a aquisição de ferro (JOHNSON, 1991).

Segundo Johnson et al. (1988) aerobactina é um sistema de seqüestro e transporte de ferro para dentro da célula que permite que *E. coli* cresça em ambientes pobres de ferro tais como urina, conferindo uma vantagem seletiva significativa para o crescimento bacteriano em condições de estresse de ferro, que ocorre no organismo durante a infecção.

Aerobactina é um composto formado a partir de duas moléculas de lisina e uma de citrato, que compete pelo ferro ligado às proteínas do hospedeiro. Aerobactina férrica liga-se a um receptor presente na membrana externa da bactéria, o qual é induzido pelo estresse de ferro e codificado pelo gene *iutA*. O gene *iucC* codifica a enzima responsável pela síntese da aerobactina.

Na maioria das cepas de *E. coli*, o sistema de aerobactina é codificado por um operon de 5 genes, sendo que 4 são responsáveis por codificar enzimas

necessárias para a síntese da aerobactina e o quinto gene codifica para o receptor de membrana externa (JOHNSON, 1991). A produção de aerobactina é regulada pela concentração intracelular de ferro.

Determinantes para aerobactina são encontrados em plasmídios ou no cromossoma bacteriano, sendo a localização cromossomal predominante nos isolados clínicos humanos. Em cepas com sistema de aerobactina cromossomal, a região codificante para aerobactina é idêntica àquela encontrada em plasmídios (JOHNSON, 1991).

Em um estudo de Johnson e colaboradores (1988) com cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com urosepse, foi verificado que determinantes para aerobactina, em amostras positivas para o gene, estavam associadas a plasmídios em 27% das cepas e em 73% a aerobactina era codificada por genes cromossomais. As cepas que apresentaram aerobactina plasmidial foram encontradas exclusivamente em pacientes comprometidos (anormalidades do trato urinário, instrumentação do trato urinário ou doença), associadas a multirresistência a antimicrobianos. Os autores propuseram que plasmídios com a combinação de aerobactina com resistência foram selecionados nos pacientes comprometidos, talvez pelo tratamento profilático que estes pacientes geralmente recebem.

Yersiniabactina (Ybt) é outro sideróforo encontrado amplamente disseminado entre cepas de ExPEC (SCHUBERT et al., 2002). A molécula de Ybt é composta de um grupo fenólico, provavelmente derivada do salicilato, assim como uma tiazolidina e dois anéis de tiazolina derivados da condensação de três resíduos de cisteína (PERRY et al., 1999), e foi primeiramente descrita em espécies de *Yersinia* (SCHUBERT et al., 1998).

Ybt é codificada por um operon cromossomal, denominado “ilha de alta patogenicidade” (HPI), por apresentar os critérios básicos de ilhas de patogenicidade, tais como uma concentração atípica de G+C, presença de genes para virulência e de mobilidade (elementos de inserção), associação com genes de tRNA e instabilidade, sendo um elemento genético móvel que foi disseminado por transferência horizontal entre diferentes gêneros da família *Enterobacteriaceae* (SCHUBERT et al., 1998) ,

especialmente em ExPEC causadoras de infecções do trato urinário, septicemia e meningite em recém-nascidos (SCHUBERT et al., 2002).

Pelludat e colaboradores (1998) identificaram quatro genes, *irp1*, *irp3*, *irp4* e *irp5*, em um fragmento de DNA cromossomal de *Y. enterocolitica*. Estes genes constituem o cluster gênico responsável pela produção de yersiniabactina, juntamente com *irp2*. Os genes *irp2* a *irp5* representam a maquinaria de síntese de yersiniabactina, com a seguinte organização: *irp2-irp1-irp3-irp4-irp5*. Os genes *irp1* e *irp2*, que codificam para as proteínas HMWP1 e HMWP2, estão envolvidos na biossíntese de yersiniabactina, enquanto *fyuA* codifica para o receptor do sideróforo na membrana externa da bactéria.

O estudo de Pelludat e colaboradores (1998) demonstrou que a inativação de *irp1* e/ou *irp2* resulta em regulação negativa das proteínas envolvidas na síntese e ligação de yersiniabactina. Inativação de *irp1* foi seguida de considerável redução das proteínas HMWP2 e FyuA, sugerindo que o operon de Ybt é sujeito a auto-regulação por seu produto, o sideróforo.

Esta regulação também foi demonstrada pelo estudo de Perry e colaboradores (1999), que demonstraram que Ybt purificada foi capaz de aumentar a captação de ferro e expressão do gene *fyuA*, que codifica o receptor de membrana externa de yersiniabactina, exercendo seu efeito regulatório em nível de transcrição gênica. Os resultados sugeriram que yersiniabactina aparentemente possui um papel regulatório no controle de sua própria síntese assim como na expressão de seu receptor de membrana externa, sendo um ativador da transcrição gênica (SCHUBERT et al., 2002).

Schubert e colaboradores (1998) sugeriram que cepas de *E. coli* que carregam o operon de Ybt são capazes de produzir o sideróforo yersiniabactina, e que este pode contribuir para a virulência destes isolados.

Em um trabalho posterior (SCHUBERT et al., 2000) testaram duas cepas de ExPEC e seus respectivos mutantes *irp1* para avaliar o efeito virulento de HPI em ratos. As cepas foram inoculadas subcutaneamente, e os resultados mostraram que as cepas selvagens estiveram significativamente mais associadas à letalidade em ratos do que as cepas mutantes.

4.3 RESISTÊNCIA SÉRICA

Bactérias são mortas pelo soro humano normal pela atividade lítica do sistema complemento. A resistência ao soro é resultado dos efeitos individuais ou combinados de polissacarídeos capsulares, polissacarídeos O e proteínas de superfície (JOHNSON, 1991).

Resistência sérica está associada a muitas cepas uropatogênicas, especialmente àquelas que causam infecções renais e sistêmicas a partir do trato urinário. Segundo Johnson (1991), cepas resistentes ao soro geralmente são mais nefropatogênicas do que as sensíveis. Isolados de pacientes com pielonefrite e cistite são mais resistentes ao soro do que cepas isoladas de pacientes com bacteriúria assintomática ou amostras fecais. Porém, pacientes com pielonefrite são menos passíveis de apresentarem uma cepa resistente ao soro quando anormalidades urológicas estão presentes, o que se deve provavelmente a falhas no efeito do soro do hospedeiro.

O plasmídio mais conhecidamente responsável pela resistência sérica é o plasmídio ColV, que carrega determinantes para a produção de colicina V. Colicina V (ColV) é comumente produzida por cepas de *E. coli* isoladas de bacteremias em humanos e animais (MINSHEW et al., 1978) e trata-se de uma proteína antibacteriana, cujo gene é transportado por plasmídios ColV (CARBONETTI e WILLIAMS, 1984), que codificam tanto para produção quanto para resistência à colicina V (JOHNSON, 1991).

Segundo Williams e Warner (1980), a presença de plasmídios ColV está associada com a habilidade aumentada de cepas bacterianas de sobreviver e proliferar em tecidos e fluidos de animais infectados.

O efeito virulento dos plasmídios ColV não é mediado pela produção de ColV, mas sim por vários fatores comumente carregados por estes plasmídios. Cepas possuidoras de plasmídios ColV podem expressar algumas propriedades fenotípicas que podem contribuir para sua patogenicidade, tais como aderência, resistência aumentada ao soro e sistema de captação de ferro (CARBONETTI and WILLIAMS, 1984; JOHNSON, 1991).

A resistência ao soro conferida por plasmídios ColV em alguns casos é atribuída à proteína Iss (increased serum survival), codificada pelo gene *iss*. Rodriguez-Siek e colaboradores (2005) demonstraram que diferentemente do que acontece em APEC, onde *iss* é encontrado em associação com *cvaC*, estes genes raramente estão associados em cepas de UPEC, nas quais *iss* é mais encontrado em plasmídios não-ColV ou em ilhas de patogenicidade cromossomais.

O gene *iss* codifica a proteína Iss, uma lipoproteína de 10-11 kDa da membrana externa bacteriana (HORNE et al., 2000), e está localizado em um plasmídio conjugativo R, com um tamanho aproximado de 100 kilobases, juntamente com outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. Este plasmídio pode ser transferido, por conjugação para outras bactérias avirulentas, inclusive outras *E. coli* (JOHNSON et al., 2002; JOHNSON et al., 2004).

O gene *iss* foi descrito pela primeira vez pelo seu papel na resistência ao soro, associado ao plasmídio ColV em isolado de *E. coli* humana, e é responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema complemento que atua na membrana celular causando a lise da célula. Portanto, ele confere à bactéria resistência ao complemento, que é um mecanismo de defesa do hospedeiro e que atua contra infecções, especialmente bacterianas, pois é capaz de promover opsonização e lise do agente infeccioso (BINNS et al., 1982).

4.4 TOXINAS

As funções específicas das toxinas, como α -hemolisina (Hly) e fator citotóxico necrotizante tipo 1 (CNF1), na patogênese de ITU mediada por UPEC são pouco entendidas. Entretanto, estas duas toxinas são coexpressas por muitas cepas (DAVIS et al., 2006), e são conhecidas por causarem citotoxicidade direta aos tecidos do hospedeiro (YAMAMOTO, 2007).

A α -hemolisina é uma proteína secretada por cepas de *E. coli* e representa um importante fator de virulência em infecções extraintestinais, como

infecções do trato urinário, meningite em neonatos, bacteremia e septicemia (MANSSON et al., 2007).

Hly foi originalmente caracterizada por sua habilidade em lisar eritrócitos, a qual está relacionada à formação de poros transmembrana nestas células e é dependente de cálcio (MAY et al., 2000), embora lise na ausência de cálcio tenha sido descrita (JOHNSON, 1991).

Alfa-hemolisina é uma toxina formadora de poros, permitindo, assim, o extravasamento do conteúdo citoplasmático da célula. Possui amplo espectro de atuação, que inclui eritrócitos, leucócitos, células endoteliais e do epitélio renal (EMÖDY et al., 2003), de maneira tal que provavelmente contribui para inflamação e injúria tecidual. A exposição de leucócitos polimorfonucleares à hemolisina estimula degranulação e liberação de leucotrienos e ATP, causa alterações morfológicas e prejudica a quimiotaxia e fagocitose (JOHNSON, 1991).

A ação da hemolisina sobre eritrócitos tem como consequência a liberação de hemoglobina e ferro, que atuam como adjuvantes para o crescimento bacteriano (MAY et al., 2000).

A produção de hemolisina está associada a cepas de *E. coli* patogênicas a humanos, especialmente àquelas causando formas mais severas de ITU. Segundo May e colaboradores (2000), aproximadamente 50% dos isolados de *E. coli* responsáveis por infecções extraintestinais em humanos são hemolíticas.

Esta citotoxina é produzida in vivo durante ITU por cepas uropatogênicas. Em estágios iniciais de infecção, quando a bactéria ascende e coloniza o trato urinário, Hly deve agir em células epiteliais, evocando resposta inflamatória (MANSSON et al., 2007). É provável que a pró-virulência da hemolisina seja multifatorial, incluindo a liberação de ferro dos eritrócitos, a interrupção da função fagocitária e a toxicidade direta a tecidos do hospedeiro. Em modelos de ITU ascendente em ratos, a produção de hemolisina esteve associada a maior colonização da bexiga e nefropatogenicidade (JOHNSON, 1991).

A produção de hemolisina é codificada por um operon constituído por 4 genes (*hlyA*, *hlyB*, *hlyC* e *hlyD*), designado *hly*. O operon pode ser encontrado em plasmídios ou no cromossomo (OROPEZA-WEKERLE et al., 1989). Segundo Johnson

(1991), *hly* está localizado no cromossoma bacteriano em isolados de humanos, em contraste com a localização plasmidial do operon comumente encontrada em isolados de animais.

Cepas de *E. coli* hemolíticas podem carregar mais de um determinante de hemolisina integrado no cromossomo (KNAPP et al., 1984; JOHNSON, 1991), e é geralmente codificada por ilhas de patogenicidade em UPEC (YAMAMOTO, 2007).

HlyA é a proteína estrutural e é secretada através da membrana citoplasmática e da membrana externa sem causar lise celular e sem que haja a clivagem de um peptídeo sinal. O primeiro passo na secreção da hemolisina é um processo dependente de energia envolvendo HlyB, enquanto a liberação na membrana externa é passiva e requer HlyD. Para ligar-se a eritrócitos e apresentar atividade hemolítica, HlyA deve ser ativada pela proteína intracelular HlyC anteriormente a sua secreção (OROPEZA-WEKERLE et al., 1989; JOHNSON, 1991). A produção de hemolisina em algumas cepas parece ser regulada pela concentração de ferro, sendo suprimida em condições de alta concentração intracelular de ferro e aumentada em baixa concentração do mesmo (JOHNSON, 1991).

Em um estudo de Triffilis e colaboradores (1994), foi observada uma significativa ação letal de cepas de *E. coli* hemolíticas incubadas em cultura de células epiteliais renais de túbulo proximal (HRPTEC). Ocorreu morte rápida de HRPTEC, reduzindo a poucas células viáveis em um período de incubação de 3 horas, em contraste com a viabilidade de virtualmente todas as células incubadas com uma cepa mutante, não produtora de hemolisina, no mesmo período de incubação. O efeito da hemolisina como fator primário da citoletalidade é apoiado por duas linhas de evidência: a presença de atividade citoletal no sobrenadante filtrado da cultura de *E. coli*, sendo que hemolisina é uma das poucas proteínas secretadas no sobrenadante da cultura e uma cepa mutante incapaz de expressar o operon *hly* foi significativamente menos letal do que a cepa selvagem.

Segundo Mansson e colaboradores (2007), hemolisina exerce efeito citolítico quando presente em altas concentrações, enquanto que em baixas concentrações tem demonstrado induzir sinalização intracelular de cálcio, levando a respostas pró-inflamatórias, como a produção de interleucinas 6 e 8.

Fator citotóxico necrotizante (CNF1) é uma toxina codificada pelo cromossomo de UPEC. É uma proteína de aproximadamente 115kDa que catalisa a deamidação de uma família de GTPases denominada Rho, que funcionam como reguladoras da organização espacial do citoesqueleto de actina.

As moléculas da família Rho de GTPases, quando ligadas ao GTP, são ativas e estimulam outras enzimas celulares. Depois que o GTP é hidrolisado a GDP, estas GTPases ficam inativas. A deamidação destas enzimas pela ação de CNF1 previne a hidrólise de GTP a GDP, o que resulta na ativação constitutiva das GTPases (DAVIS et al., 2005), levando à remodelação do citoesqueleto de actina e formação de extensões de membrana na célula hospedeira, com um efeito geral de bloqueio da citocinese e conseqüente formação de células gigantes multinucleadas (MILLS et al., 2000; RIPPERE-LAMPE et al., 2001; DAVIS et al., 2005; KOUOKAM et al., 2006).

A reciclagem dos membros da família Rho de GTPases entre as formas ativa e inativa é essencial para o funcionamento adequado de células eucarióticas, tais como neutrófilos (DAVIS et al., 2006), que são responsáveis pela defesa do hospedeiro a infecções bacterianas.

CNF1 apresenta-se como uma toxina A-B, na qual o domínio catalítico A está localizado na região carboxi-terminal e o domínio B de ligação celular está na região amino-terminal. Nenhum peptídeo de sinalização típico é encontrado na seqüência de CNF1, e o mecanismo de secreção desta toxina continua desconhecido (KOUOKAM et al., 2006).

Kouokam e colaboradores (2006) demonstraram que CNF1 é secretado por UPEC por um mecanismo que inclui vesículas de membrana externa. CNF1 foi detectada no sobrenadante de cultura, indicando que é uma proteína secretada, estando associada a vesículas de membrana externa, que fornecem um meio de transporte seguro para a toxina. Esta associação de CNF1 a vesículas também foi demonstrada por Davis e colaboradores (2006) que, estudando o efeito de CNF1 sobre neutrófilos polimorfonucleares, demonstraram que as vesículas interagem com neutrófilos, diminuindo sua atividade antimicrobiana. Também foi verificada uma diminuição da resposta quimiotática de neutrófilos polimorfonucleares quando incubadas com as vesículas contendo CNF1, porém quando estas células foram

expostas a CNF1 purificada, nenhum efeito na quimiotaxia foi verificado. Este resultado demonstra a necessidade das vesículas para a interação com estas células, sugerindo que tais vesículas devem atuar como um importante veículo para CNF1 durante infecção por UPEC.

Para avaliar a contribuição de CNF1 para a uropatogênese, Mills e colaboradores (2000) estudaram o efeito da intoxicação por CNF1 em culturas de células de bexiga, ureter e rim. Foi demonstrado que cepas de UPEC produtoras de CNF1 são capazes de matar células uroepiteliais da bexiga, e que esta morte ocorre por um mecanismo apoptótico. Os autores propõe um modelo em que CNF1, assim como fímbria tipo 1, promove descamação de células uroepiteliais infectadas por UPEC por indução de apoptose nas mesmas. A morte celular causada por CNF1 ou danos teciduais conseqüentes de resposta inflamatória intensa permitem à cepa infectante ter acesso a tecidos mais profundos (RIPPERE-LAMPE et al., 2001).

Mills e colaboradores (2000) também demonstraram que CNF1 deve promover captura de bactérias pelas células epiteliais do hospedeiro, devido a observação de indução da fagocitose em células HEp-2 estimulada pela toxina. Ainda neste estudo, foi observada ausência de formação de fibras de tensão de actina em todos os tipos celulares testados, um fenômeno considerado essencial de intoxicação por CNF1 em células HEp-2. O fenótipo típico de multinuclearidade anormal não foi evidente em cortes de bexiga em modelo de infecção experimental em ratos realizado por Rippere-Lampe e colaboradores (2001).

Neste estudo de Rippere-Lampe e colaboradores (2001), UPEC expressando CNF1, quando comparada à sua mutante isogênica, causou maior resposta inflamatória aguda na bexiga, colonizou mais extensivamente em experimento de coinfeção e apresentou maior taxa de sobrevivência quando incubada com neutrófilos humanos. Portanto, considera-se que CNF1 facilita a sobrevivência de UPEC durante a resposta inflamatória aguda, modulando a função de leucócitos polimorfonucleares, incluindo a regulação negativa de fagócitos (DAVIS et al., 2005).

5 GRUPOS FILOGENÉTICOS

Quatro grupos filogenéticos principais, A, B1, B2 e D, foram descritos por Herzer e colaboradores (1990) usando a técnica de MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) em uma coleção de *E. coli* de referência (ECOR) (OCHMAN e SELANDER, 1984). A coleção ECOR compreende 72 cepas de *E. coli* isoladas de humanos e outros mamíferos de diversas áreas geográficas, e representa parte da diversidade clonal de *E. coli* (RESTIERI et al., 2007).

A análise filogenética tem sido amplamente utilizada para caracterizar cepas de *E. coli* que causam infecções extraintestinais em estudos epidemiológicos. Em geral, ExPEC de maior potencial de virulência pertencem ao grupo filogenético B2 e, em menor extensão, ao grupo D, enquanto cepas comensais ou de menor potencial virulento pertencem aos grupos A e B1 (PICARD et al., 1999; CLERMONT et al., 2000; DURIEZ et al., 2001; BINGEN-BIDOIS et al., 2002; MAYNARD et al., 2004).

Cepas de ExPEC do grupo B2 geralmente contêm numerosos determinantes de virulência implicados em infecções extraintestinais (ZHANG et al., 2002). As pertencentes ao grupo D geralmente apresentam menor número de fatores de virulência do que as do grupo B2, porém também estão associadas a infecções extraintestinais. Já cepas dos grupos A e B1 estão raramente associadas a infecções extraintestinais (RESTIERI et al., 2007), e freqüentemente possuem menos fatores de virulência e, portanto, seriam menos capazes de causar infecção, exceto na presença de comprometimento significativo do hospedeiro (PICARD et al., 1999; JOHNSON et al., 2001; BINGEN-BIDOIS, 2002).

Johnson e colaboradores (2001), estudando 182 cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com bacteremia, encontraram uma prevalência de 65% de cepas pertencentes ao grupo B2. Zhang e colaboradores (2002), estudando cepas isoladas de infecção de trato urinário, encontraram uma prevalência de 69% de grupo B2, enquanto em um estudo de Restieri e colaboradores (2007), a porcentagem chegou a 87% em cepas isoladas de ITU.

Atualmente, o grupamento filogenético pode ser realizado por MLEE ou ribotipagem, porém ambas as técnicas são complexas e demoradas e requerem uma coleção de cepas tipadas. A criação de uma biblioteca subtrativa de cepas de *E. coli* pertencentes a diferentes grupos filogenéticos e a caracterização de um fragmento de DNA de 14.9 kb fortemente associado a cepas causadoras de meningite neonatal sugeriram que certos genes ou fragmentos de DNA devem ser marcadores específicos dos grupos filogenéticos.

Com base nestes resultados, Clermont e colaboradores (2000) desenvolveram um método, baseado em PCR, de identificação rápida e simples dos grupos filogenéticos de *E. coli*. O método tem como alvo os genes *chuA*, requerido para o transporte de heme em *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, e *yjaA*, gene descrito inicialmente em *E. coli* K12 com função desconhecida, e também um fragmento de DNA denominado TSPE4.C2.

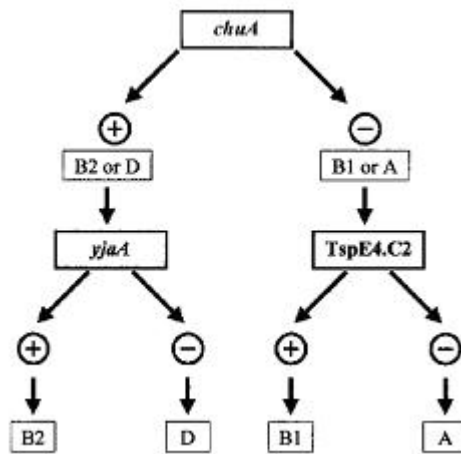


Fig. 1 – Chave dicotômica para determinar o grupo filogenético de cepas de *E. coli* baseado em ampliações por PCR (CLERMONT et al., 2000).

REFERÊNCIAS

- BIELASZEWSKA, M., DOBRINDT, U., GÄRTNER, J., GALLITZ, I., HACKER, J., KARCH, H., MÜLLER, D., SCHUBERT, S., SCHMIDT, M. A., SORSA, L. J., ZDZIARSKI, J. (2007). Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.** 297:625-639.
- BINGEN-BIDOIS, M., CLERMONT, O., BONACORSI, S., TERKI, M., BRAHIMI, N., LOUKIL, C., BARRAUD, D., BINGEN, E. (2002). Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. **Infect. Immun.** 70:3216-3226.
- BINNS, M.M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R.P. (1982). Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. **Infect. Imm.** 35:654-659.
- BLOMFIELD, I. C. (2001). The regulation of *pap* and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. **Adv. Microb. Physiol.** 45:1-49.
- BONACORSI, S., HOUDOUIN, V., MARIANI-KURKDJIAN, P., MAHJOURB-MESSAI, F., BINGEN, E. (2006). Comparative prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* causing urinary tract infection in male with and without bacteremia. **J. Clin. Microbiol.** 44:1156-1158.
- CARBONETTI, N. H.; WILLIAMS, P. H. (1984). A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30. **Infect. Immun.** 46:7-12.
- CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:4555-4558.
- DAVIS, J. M., RASMUSSEN, S. B., O'BRIEN, A. D. (2005). Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. **Infect. Immun.** 73:5301-5310.
- DAVIS, J. M., CARVALHO, H. M. RASMUSSEN, S. B., O'BRIEN, A. D. (2006). Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. **Infect. Immun.** 74:4401-4408.

DURANT, L., METAIS, A., SOULAMA-MOUZE, C., GENEVARD, J. M., NASSIF, X., ESCAICH, S. (2007). Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. ***Infect. Immun.*** 75:1916-1925.

DURIEZ, P., CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E., CHAVENTRÉ, A., ELION, J., PICARD, B., DENAMUR, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. ***Microbiology.*** 147:1671-1676.

EMÖDY, L., KERÉNYI, M., NAGY, G. (2003) Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. ***Int. J. Antimicrob. Agents.*** 22:29-33.

GUIDONI, E. B. M., DALPRA, V. A., FIGUEIREDO, P. M., LEITE, D. S., MÍMICA, L. C., YANO, T., BLANCO, J. E., TOPOROVSKI, J. (2006). *E. coli* virulence factors in children with neurogenic bladder associated with bacteriuria. ***Pediatr. Nephrol.*** 21:376-381.

GUNTHER IV, N. W., SNYDER, J. A., LOCKATELL, V., BLOMFIELD, I., JOHNSON, D. E., MOBLEY, H. L. T. (2002). Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbrial mutants in which invertible element is phase-locked on or off. ***Infect. Immun.*** 70:3344-3354.

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. ***Infect. Immun.*** 72:593-597.

HERZER, P. J., INOUE, S., INOUE, M., WHITTAM, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. ***J Bacteriol.*** 172:6175-6181.

HOLDEN, N. J., GALLY, D. L. (2004). Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. ***J. Med. Microbiol.*** 53:585-593.

HOLDEN, N. J., TOTSIKA, M., MAHLER, E., ROE, A. J., CATHERWOOD, K., LINDNER, K., DOBRINDT, U., GALLY, D. L. (2006). Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. ***Microbiology.*** 152:1143-1153.

- HORNE, S.M.; MCDONOUGH, J.P.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. (2000). Cloning and sequencing of *iss* gene from virulent avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.** 44:179-184.
- HOOTON, T. M. (2000). Pathogenesis of urinary tract infections: an update. **J Antimicrob. Chemother.** 46:1-7.
- HULL, R. A., RUDY, D. C., WIESER, I. E., DONOVAN, W. H. (1998). Virulence factors of *Escherichia coli* isolates from patients with symptomatic and asymptomatic bacteriuria and neuropathic bladders due to spinal cord and brain injuries. **J. Clin. Microbiol.** 36:115-117.
- JOHNSON, J. R.; MOSELEY, S. L.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. (1988). Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. **Infect. Immun.** 56:405-412.
- JOHNSON, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.** 4:80-128.
- JOHNSON, J. R., RUSSO, T. A., BROWN J. J., STAPLETON, A. (1998). *papG* alleles of *Escherichia coli* strains causing first-episode or recurrent acute cystitis in adult women. **J. Infect. Dis.** 177:97-101.
- JOHNSON, J. R., STELL, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.** 181:261-272.
- JOHNSON, J. R., STELL, A. L., SCHEUTZ, F., O'BRYAN, T. T., RUSSO, T. A., CARLINO, U. B., FASCHING, C., KAVLE, J., VAN DIJK, L., GAASTRA, W. (2000). Analysis of the F antigen-specific *papA* alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay. **Infect. Immun.** 68:1587-1599.
- JOHNSON, J. R., O'BRYAN, T. T., KUSKOWSKI, M., MASLOW, J. N. (2001). Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. **Infect. Immun.** 69:5363-5374.

JUSTICE, S. S., HUNG, C., THERIOT, J. A., FLETCHER, D. A., ANDERSON, G. G., FOOTER, M. J., HULTGREN, S. J. (2004). Differentiation and development pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. **PNAS**. 101: 1333-1338.

KNAPP, S., HACKER, J., THEN, I., MÜLLER, D., GOEBEL, W. (1984). Multiple copies of hemolysin genes and associated sequences in the chromosomes of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Bacteriol.** 159:1027-1033.

KOBAYASHI, R. K., GAZIRI, L. C., VENÂNCIO, E. J., VIDOTTO, M. C. (2007). Detection of Tsh protein mucinolytic activity by SDS-PAGE. **J. Microbiol. Methods**. 68: 654-655.

KOSTAKIOTI, M., STATHOPOULOS, C. (2004). Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.** 72:5548-5554.

KOUOKAM, J. C., WAI, S. N., FÄLLMAN, M., DOBRINDT, U., HACKER, J., UHLIN, B. E. (2006). Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 74:2022-2030.

LE BOUGUENEC, C., ARCHAMBAUD, M., LABIGNE, A. (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesion-encoding operon in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 30:1189-1193.

MANSSON, L. E., KJÄLL, P., PELLETT, S., NAGY, G., WELCH, R. A., BÄCKHED, F., FRISAN, T., RICHTER-DAHLFORS, A. (2007). Role of lipopolysaccharide-CD14 complex for the activity of hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 75:997-1004.

MAY, A. K., GLEASON, T. G., SAWYER, R. G., PRUETT, T. L. (2000). Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. **Infect. Immun.** 68:176-183.

MAYNARD, C., BEKAL, S., SANSCHAGRIN, F., LEVESQUE, R. C., BROUSSEAU, R., MASSON, L., LARIVIÈRE, S., HAREL, J. (2004). Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. **J. Clin. Microbiol.** 42:5444-5452.

MILLS, M., MEYSICK, K. C., O'BRIEN, A. D. (2000). Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. **Infect. Immun.** 68:5869-5880.

MINSHEW, B. H.; JORGENSEN, J.; COUNTS, G. W.; FALKOM, S. (1978). Association of hemolysin production, hemagglutination of human erythrocytes, and virulence for chicken embryos of extraintestinal *Escherichia coli* isolates. **Infect. Immun.** 20:50-54.

MYSOREKAR, I. U., HULTGREN, S. J. (2006). Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. **PNAS.** 103:14170-14175.

OBATA-YASUOKA, M., BA-THEIN, W., TSUKAMOTO, T., YOSHIKAWA, H., HAYASHI, H. (2002). Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*. **Microbiology.** 148:2754-2752.

OCHMAN, H., SELANDER, R. K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. **J. Bacteriol.** 157:690-693.

OELSCHLAEGER, T. A., DOBRINDT, U., HACKER, J. (2002). Virulence factors of uropathogens. **Curr. Opin. Urol.** 12:33-38.

OROPEZA-WEKERLE, R. L., MÜLLER, E., KERN, P., MEYERMANN, R., GOEBEL, W. (1989). Synthesis, inactivation, and localization of extracellular and intracellular *Escherichia coli* hemolysins. **J. Bacteriol.** 171:2783-2788.

PELLUDAT, C., RAKIN, A., JACOBI, C. A., SCHUBERT, S., HEESEMANN, J. (1998). The Yersiniabactin Biosynthetic Gene Cluster of *Yersinia enterocolitica*: Organization and Siderophore-Dependent Regulation. **J. Bacteriol.** 180:538-546.

PERRY, R. D., BALBO, P. B., JONES, H. A., FETHERSON, J. D., DEMOLL, E. (1999). Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. **Microbiology.** 145:1181-1190.

PICARD, B., GARCIA, J. S., GOURIOU, S., DURIEZ, P., BRAHIMI, N., BINGEN, E., ELION, J., DENAMUR, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** 67:546-553.

RESTIERI, C., GARRISS, G., LOCAS, M. C., DOZOIS, C. M. (2007). Autotransporter-Encoding Sequences Are Phylogenetically Distributed among *Escherichia coli* Clinical Isolates and Reference Strains. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 73:1553-1562.

RIPPERE-LAMPE, K. E., O'BRIEN, A. D., CONRAN, R., LOCKMAN, H. A. (2001). Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf(1)) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. ***Infect Immun.*** 69:3954-3964.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E., GIDDINGS, C. W., DOETKOTT, C., JOHNSON, T. J., FAKHR, M. K., NOLAN, L. K. (2005). Comparison of *Escherichia coli* implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. ***Microbiology.*** 151:2097-2110.

ROOS, V., ULETT, G. C., SCHEMBRI, M. A., KLEMM, P. (2006). The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. ***Infect. Immun.*** 74:615-624.

SABATÉ, M., MORENO, E., PÉREZ, T., ANDREU, A., PRATS, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. ***Clin. Microbiol. Infect.*** 12: 880-886.

SALYERS, A. A., WHITT, D. D. (2001). *Escherichia coli* extraintestinal infections. In Bacterial pathogenesis - A molecular approach. 2nd. ed. Washington, D.C.: ASM Press. p. 422-436.

SCHLAGER, T. A., DILKS, M. D. S., TRUDELL, R. N., WHITTAM, T. S., HENDLEY, M. D. (1995). Bacteriuria in children with neurogenic bladder treated with intermittent catheterization: natural history. ***J. Pediatr.*** 126(3): 490-495.

SCHLAGER, T. A., WHITTAM, T. S., HENDLEY, J. O., WILSON, R. A., BHANG, J., GRADY, R., STAPLETON, A. (2000). Expression of virulence factors among *Escherichia coli* isolated from the periurethra and urine of children with neurogenic bladder on intermittent catheterization. ***Pediatr. Infect. Dis J.*** 19:37-41.

SCHMIDT, H., HENSEL, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. ***Clin. Microbiol. Rev.*** 17:14-56.

SCHUBERT, S., RAKIN, A., KARCH, H., CARNIEL, E., HEESEMANN, J. (1998). Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. ***Infect. Immun.*** 66:480-485.

SCHUBERT, S., PICARD, B., GOURIOU, S., HEESEMANN, J., DENAMUR, E. (2002). *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. ***Infect. Immun.*** 70:5335-5337.

SKYBERG, J. A., JOHNSON, T. J., JOHNSON, J. R., CLABOTS, C., LOGUE, C. M., NOLAN, L. K. (2006). Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. ***Infect. Immun.*** 74:6287-6292.

SNYDER, J. A., LLOYD, A. L., LOCKATELL, C. V., JOHNSON, D. E., MOBLEY, H. L. T. (2006). Role of phase variation of type 1 fimbriae in a uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. ***Infect Immun.*** 74:1387-1393.

SOTO, S. M., SMITHSON, A., HORCAJADA, J. P., MENSA, J. P., VILA, J. (2006). Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. ***Clin. Microbiol. Infect.*** 12:1034-1036.

STATHOPOULOS, C., PROVENCE, D. L., CURTISS III, R. (1999). Characterization of the avian pathogenic hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. ***Infect. Immun.*** 67:772-781.

TRIFILLIS, A. L., DONNENBERG, M. S., CUI, X., RUSSELL, R. G., UTSALO, S. J., MOBLEY, H. L. T., WARREN, J. W. (1994). Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. ***Kidney International.*** 46:1083-1091.

WAITES, K. B., CANUPP, K. C., ROPER, J. F., CAMP, S. M., CHEN, Y. (2006). Evaluation of 3 methods of bladder irrigation to treat bacteriuria in persons with neurogenic bladder. ***J. Spinal Cord Med.*** 29:217-226.

WILLIAMS, P. H., WARNER, P. J. (1980). ColV plasmid-mediated, Colicin V-independent iron uptake system of invasive strains of *Escherichia coli*. ***Infect. Immun.*** 29:411-416.

YAMAMOTO, S. (2007). Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Chemother.** 13:68-73.

ZHANG, L., FOXMAN, B., MARRS, C. (2002). Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. **J. Clin. Microbiol.** 40:3951-3955.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar genotipicamente as amostras de *Escherichia coli* isoladas de crianças com bexiga neurogênica de Londrina, Paraná quanto à presença de fatores de virulência relacionados a infecções do trato urinário, agrupar as amostras nos diferentes grupos filogenéticos e estudar a similaridade genética entre os isolados de diferentes sítios de cada paciente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar a frequência de diferentes genes que codificam para adesinas, sideróforos, fatores de resistência sérica e toxinas relacionadas a UPEC.
2. Classificar as cepas isoladas nos diferentes grupos filogenéticos pela técnica de PCR.
3. Correlacionar a presença de genes para fatores de virulência com grupos filogenéticos.
4. Realizar tipagem molecular das cepas por BOX-PCR para possível avaliação da via de infecção.

Detection of virulence genes, distribution in phylogenetic groups and genetic similarities among *Escherichia coli* strains isolated from urine, periurethral and perianal regions of children with neurogenic bladder.

NIMTZ, A. V.; TAVARES, M. S., PELOI, H. M., VIDOTTO, M. C., KOBAYASHI, R. K., SARIDAKIS, H. O.

ABSTRACT

Neurogenic bladder occurs as consequence of different events that affect the normal function of the organ. Urinary tract infection (UTI) is the most frequent complication found in patients with such alteration, and *Escherichia coli* is the most commonly microorganism isolated from this infection. In this study, *E. coli* strains isolated from urine and periurethral and perianal regions of 16 children with neurogenic bladder were analyzed for the presence of genes coding for some virulence factors related to UPEC (uropathogenic *E. coli*) using PCR technique. Virulence factors studied were type 1 fimbriae (*fimH*), P fimbriae (*papC* and *papG*), temperature-sensitive hemagglutinin (*tsh*), yersiniabactin receptor (*fyuA*), aerobactin receptor (*iutA*), ColV plasmid (*cvaC*), increased serum survival (*iss*), hemolysin (*hlyA*) and cytotoxic necrotizing factor (*cnf1*). Strains were assigned into phylogenetic groups according to Clermont et al. (2000) and their genetic similarities were analyzed using BOX-PCR technique. We found a high frequency of *fimH* (100%), *fyuA* (95,6%) and *iutA* (91,3%) among the isolates. *cnf1*, *iss* and *hlyA* were present in 56,5%, 39,1% and 36,2% of the strains, respectively. The other studied genes occurred in less than 30% of the strains. Most of the isolates were classified as belonging to pathogenic groups B2 and D (37,7% and 30,4%, respectively). BOX-PCR confirmed the hypothesis of intestinal origin of *E. coli* strains causing urinary tract infections, and demonstrated the importance of periurethral colonization by these microorganisms.

KEY WORDS: *E. coli*, neurogenic bladder, virulence genes, urinary tract infection, phylogenetic groups.

INTRODUCTION

Neurogenic bladder may be caused by many diseases or events affecting the nervous system responsible for controlling the urinary tract and bacteriuria is present in approximately 70% of patients with this condition (GUIDONI et al., 2006). Urinary tract infections (UTIs) are among the most common human infections and *Escherichia coli* is responsible for at least 80% of these infections (KOUOKAM et al., 2006; ROOS et al., 2006). The severity of the UTI depends both on the virulence of the infecting bacteria and on susceptibility of the host (JOHNSON, 1991; LE BOUGUENEC et al., 1992).

To achieve pathogenicity, uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains produce several virulence factors such as adhesins, hemolysin, aerobactin siderophore system, capsule and cytotoxic necrotizing factor type 1 (KOUOKAM et al., 2006; YAMAMOTO, 2007). Virulence factors are traits that allow bacteria to adhere, colonize, cause tissue invasion or destruction and alter host inflammatory response (MAY et al., 2000).

Strains causing UTI in patients with anatomically and functionally normal urinary tracts often harbor several virulence factors. In contrast, patients with urinary tract abnormalities are more susceptible to colonization of the urinary tract by conventional *E. coli* lacking these traits (LE BOUGUENEC et al., 1992; JOHNSON and STELL, 2000). According to Schlager et al. (2000), inadequate bladder emptying, a condition found in patients with neurogenic bladder, may be one of the facts that allow *E. coli* without known virulence determinants to cause UTI.

Picard et al. (1999) reported that the status of the host may be critical to the development of an infection, independent of the presence or absence of virulence factors, and, thus, the “virulent” or “nonvirulent” character of a strain cannot be

systematically inferred from the circumstances in which the strain was isolated (asymptomatic or symptomatic) or phylogenetic group to which strain is assigned into.

We undertook the present study to gain an understanding of the prevalence of virulence genes and phylogenetic distribution *E. coli* isolates from children with neurogenic bladder. For this purpose, we decided to study not only bacteria present in urine of these patients, but also strains of *E. coli* that were carried by these patients colonizing the periurethral and perianal regions, which constitute the main source of bacteria to urinary tract infections. We also submitted the strains to BOXA1R technique, to study the genetic similarity among the strains and, possibly, define the major source of UTI.

The characterization and comparison of virulence genotypes and affiliation into phylogenetic groups with the help of BOXA1R technique may lead to a comprehensive picture of the origins and spread of virulence factors within the population of the isolates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Samples for this study were collected from periurethra and perianal regions and urine of children with neurogenic bladder attended at the Ambulatory of Neurogenic Bladder of the Universidade Estadual de Londrina. The first sampling was performed when children presented no symptoms of UTI. The second one was realized when the symptoms of UTI were present.

Samples from periurethra and perianal regions were collected with sterile swabs and grown in MacConkey agar. Urines were cultured in CLED and MacConkey. The bacterial species were identified following the methods described by Toledo *et al.* (1982 a/b).

Determination of antibiotic susceptibility. Susceptibility of the strains to 9 antimicrobial agents was determined by disk diffusion technique (Bauer *et al.*, 1966; CLSI, 2005). The following antibiotics were used: nalidixic acid, ampicillin, cephalotin, ceftazidime, ceftriaxone, ciprofloxacin, cotrimoxazole (sulfamethoxazole-trimethoprim), nitrofurantoin and the association of piperacilin and tazobactam.

DNA extraction. The DNA extraction was realized as previously described by Kaschuk *et al.* (2006). To confirm the density and purity of the DNA, samples were submitted to eletrophoresis in 1% agarose gel for 40 minutes at 80V and visualized in Vilber Lourmat ETX 20.M transilluminator.

Virulence factors. *E. coli* isolates were tested for 10 virulence genes of UPEC, including adhesins such as type 1 fimbriae (*fimH*), fimbriae P (*papC* and *papG*); temperature-sensitive hemagglutinin (*tsh*); siderophore yersiniabactin receptor (*fyuA*) and receptor for aerobactin (*iutA*); factors associated with complement resistance such as ColV plasmid (*cvaC*) and increased serum survival (*iss*) and toxins as hemolysin (*hlyA*) and cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*). Primer sequences are presented in table 1. Amplification was done as described by Delicato *et al.* (2003), with some modifications. Reactions mixtures were heated to 94°C for 5 min to activate *Taq* DNA polymerase. This was followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min (temperatures in Table 1), extension at 72°C for 2 min and a final extension at 72°C for 7 min. The amplicons were eletrophoresed in 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide. A 1Kb plus DNA Ladder™ was used as standard.

Table 1. Oligonucleotides sequences, annealing temperatures, MgCl₂ concentrations and sizes of amplified fragments

Genes	Sequences (5' – 3')	Fragment sizes	[MgCl ₂]	Annealing temperatures	References
<i>fimH</i>	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG GCA GTC ACC TGC CCT CCG TGG	508 pb	2.5mM	63°C	Johnson and Stell (2000)
<i>papC</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	328 pb	1.5mM	65°C	Le Bouguenec et al. (1992)
<i>papG</i>	CTG TAA TTA CGG AAG TGA TTT CTG ACT ATC CGG CTC CGG ATA AAC CAT	1070 pb	1.5mM	63°C	Johnson and Stell (2000)
<i>tsh</i>	GGT GGT GCA CTG GAG TGG AGT CCA GCG TGA TAG TGG	620 pb	1.5mM	55°C	Dozois et al. (2000)
<i>fyuA</i>	TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA	780 pb	2.5mM	63°C	Johnson and Stell (2000)
<i>iutA</i>	GGC TGG ACA TGG GAA CTG G CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG	300 pb	2.0mM	63°C	Johnson and Stell (2000)
<i>cvaC</i>	CAC ACA CAA ACG GGA GCT GTT CTT CCC GCA GCA TAG TTC CAT	680 pb	2.0mM	63°C	Johnson and Stell (2000)
<i>iss</i>	GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC CGC CTC GGG GTG GAT AA	760 pb	2.0mM	61°C	Delicato et al. (2003)
<i>hlyA</i>	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	1177 pb	2.5mM	63°C	Johnson and Stell (2000)
<i>cnf1</i>	AGG AAG TTA TAT TTC CGT AGG GTA TTT GCC TGA ACC GTA A	498 pb	2.5mM	60°C	Johnson and Stell (2000)

Phylogenetic groups. The classification of the *E. coli* isolates in phylogenetic groups was performed following the PCR based method described by Clermont et al. (2000). The reaction was carried out in a final volume of 20µL containing 2.0mM of MgCl₂, 0.2mM of each dNTP, 1X PCR buffer, 20pmol of each primer, 2.5U of *Taq* polymerase and 3 µL of DNA.

The primers used were *chuA.1* (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3 ') and *chuA.2* (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'), *yjaA.1* (5'-TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG-3') and *yjaA.2* (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'), and TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-3') and TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'), which generate 279 -, 211 - and 152-pb fragments respectively. A two-step triplex

polymerase reaction was assessed, as follows: denaturation for 4 minutes at 94°C, 30 cycles of 5 s at 94°C and 10 s at 59°C, and a final extension step of 5 min at 72°C.

To determine the phylogenetic group of each strain, the following dichotomous tree was used (Figure 1).

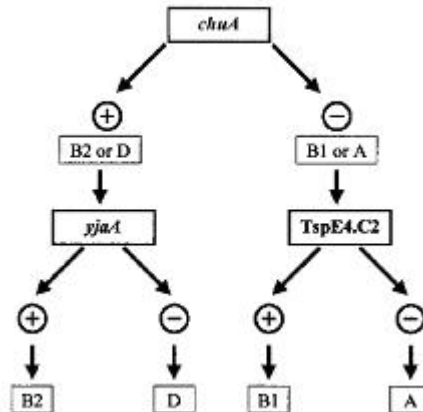


Fig. 1. Dichotomous tree to determine the phylogenetic group of *E. coli* strains using the results of PCR amplification (CLERMONT et al., 2000).

BOX A1R-PCR. The amplification of the repetitive regions of the DNA was carried out with the primer BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic *et al.*, 1994). The reaction with a final volume of 25µL, contained 2.4mM of MgCl₂, 0.3mM of each dNTP, 1X PCR buffer, 20pmol of primer and 1U of *Taq* polymerase. PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 7 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 52°C for 1 min and extension at 65°C for 8 min, followed by a final extension at 65°C for 16 min. The amplicons were electrophoresed in 1.5% agarose gel (230 mm X 200 mm) at 120V for 6 hours. A 1Kb plus DNA LadderTM was used as standard.

Gel was stained with ethidium bromide, destained with distilled water, observed and photographed by use of an ultraviolet transilluminator and capture system.

Band patterns obtained were analyzed by Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium 3.50 version) and for the aggroupment analysis the UPGMA algorithm (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) was used (Sneath & Sokal, 1973) and Jaccard coefficient with 2% of tolerance.

RESULTS

Bacterial strains. We isolated 69 *E. coli* strains from 16 children. Ten children were submitted to two samplings, resulting 52 strains, of which 24 were from the first and 28 from the second sampling. The other 6 children did not present signs of UTI during the period of this study and so were submitted to only one sampling, resulting in 17 *E. coli* strains.

Table 2. Distribution of resistance profiles, virulence genes and phylogenetic groups among the isolates.

Strains	Drug resistance	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>papG</i>	<i>tsh</i>	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	<i>cvaC</i>	<i>iss</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	Phylogenetic group
1UR	CFL	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	B1
1PU	NAL	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	B1
1PA	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	B1
1-2 nd UR	NAL	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	B1
1-2 nd PU	NAL	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	B1
1-2 nd PA	NAL	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	A
4UR	CFL-CRO	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	D
4PU	CFL-CRO	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	D
6PA	CFL-CRO	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	D
6-2 nd UR	NAL-CIP-SUT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1
6-2 nd PA	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	A
7UR	SUT	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	D
7PU	CFL-SUT	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	D
7PA	CFL-SUT	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	D
8PA	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	D
8-2 nd UR	CFL	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	B2
8-2 nd PU	CFL	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	B2
8-2 nd PA	CFL	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	B2
11UR	SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	B2
11PU	SUT	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	B2
11PA	SUT	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	B2
13UR	NAL	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	A
13PU	NAL-CFL	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	B2
13PA	NAL	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	A
13-2 nd UR	NAL-SUT	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	B1
13-2 nd PU	NAL-SUT	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	B1
13-2 nd PA	NAL-SUT	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	B1
14UR	SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	B2
14PU	SUT	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	D
14PA	SUT	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	B2
15UR	SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	B2
15PU	SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	B2

15PA	SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	B2
15-2 nd UR	SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	B2
15-2 nd PU	SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	B2
15-2 nd PA	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	D
18UR	SUT	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	D
18PU	SUT	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	D
18PA	SUT	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	D
18-2 nd UR	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	D
18-2 nd PA	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	D
20UR	CFL-SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	A
20PU	SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	A
20PA	SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	A
23UR	CFL-SUT	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	D
23PU	CFL-SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	B2
23PA	CFL-SUT	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	B2
23-2 nd UR	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	A
23-2 nd PU	CFL-SUT	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	B2
23-2 nd PA	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	A
30UR	NAL	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	D
30PU	NAL	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	D
30PA	NAL	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	D
30-2 nd UR	NAL	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	D
30-2 nd PU	CFL	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	B1
30-2 nd PA	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	B2
34UR	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	B2
34PU	SUT	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	B2
34PA	SUT	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	A
38UR	NAL-CFL-CRO	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	D
38PU	NAL-CFL-CRO-SUT-NIT	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	B2
38PA	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	A
38-2 nd UR	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	B2
38-2 nd PU	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	B2
38-2 nd PA	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	D
43PA	SUT	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	B1
43-2 nd UR	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	B2
43-2 nd PU	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	B2
43-2 nd PA	SUT-NIT	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	B2

CFL=cephalotin, NAL=nalidixic acid, SUT=cotrimoxazole (sulfamethoxazole + trimethoprim), CRO=ceftriaxone, NIT=nitrofurantoin, CIP=ciprofloxacin.

Drug Resistance. The 69 *E. coli* isolates presented no resistance to the following antimicrobial drugs: ampicillin, ceftazidime and the association of piperacilin and tazobactam. Out of the isolates, 16 (23,2%) were susceptible to all antibiotics tested. Among the 53 resistant strains, 33 (62,26%) were resistant to cotrimoxazole, 18 (33,96%) to cephalotin and 17 (32,07%) to nalidixic acid. Resistance to ceftriaxone, nitrofurantoin and ciprofloxacin was found in 5, 2 and 1 strain, respectively. Thirty five strains were resistant to only one antibiotic, 15 to a combination of 2 drugs, 2 were resistant to 3 drugs and one strain presented resistance to 5 drugs (NAL-CFL-CRO-

SUT-NIT) (Table 2). No difference was observed in antimicrobial resistance between strains isolated from children with UTI and those not associated with UTI .

Virulence genes and phylogenetic groups. Among the 69 isolates, 10 virulence gene regions ranged in prevalence from 10,1% (*papC*) and 100% (*fimH*). The most frequent virulence genes found were *fimH* (100%), *fyuA* (95,6%) and *iutA* (91,3%). Some other genes, like *cnf1* (56,5%), *iss* (39,1%) and *hlyA* (36,2%), were also present in high percentage of the isolates. The other genes were present in less than 30% of the strains (Table 3).

Genes encoding for P fimbriae (*papC* and *papG*) were found in few strains (10,1% and 13%, respectively); *papC*, was found only in strains from the first sampling group (asymptomatic), always combined with *papG*, whereas *papG* was found alone in 2 strains isolated from perianal region (1-2ndPA and 38-2ndPA), suggesting the presence of partial copies or deletions in *pap* operon. Genetic determinants for fimbriae P were not found in any case of symptomatic UTI.

Gene encoding for the autotransporter protein Tsh was found in 8 isolates (11,6%). These strains belonged to two patients (30 and 38), and occurred in only one strain from perianal region.

Iron acquisition systems occurred in most of the isolates; *fyuA* and *iutA* were the second and third most prevalent genes found, respectively (95,6% vs. 91,3%; all strains harbored *fimH*). Only three strains did not present *fyuA*, 2 urine isolates (1 from the first and 1 from the second sampling) and 1 strain from perianal region (2nd sampling) and these strains were isolated from different patients (6, 13 and 15). The genetic determinant *iutA* (receptor for aerobactin) was absent in 6 strains, 5 of them isolated

from urine (3 from the first and 2 from the second sampling) and 1 of perianal region (2nd sampling).

Genetic determinant for colicin V production and also a marker for colV plasmid, *cvaC*, was present in 18 strains, 12 of them were collected from only 2 patients (13 and 38 - 6 strains from each). Gene for increased serum survival, *iss*, was found in 27 strains. In 16 (59,26%) of these strains, *cvaC* was also found, while in the other 11 strains *cvaC* was not present.

Genetic determinant for Hly was found in 25 (36,2%) of the isolates. Cytotoxic necrotizing factor gene-encoding *cnf1* was present in 39 strains (56,5%).

Most of the isolates were assigned into phylogenetic groups B2 and D, 37,7% and 30,4%, respectively. The other isolates were equally distributed between A and B1 groups (15,95%). There was little variation in the distribution of phylogenetic groups among the sites of isolation, with group A strains being more often isolated from perianal region. Isolates from urine and periurethra showed a slight predominance of B2 and D phylogenetic groups. Two strains of group A and 1 strain of B1 were found causing asymptomatic bacteriuria, and one and three strains of each group, respectively, were isolated from UTI (2nd sampling). Strains belonging to phylogenetic groups B2 and D were responsible for 77% of the asymptomatic bacteriuria cases and 60% of UTI cases.

Table 3. Frequency of virulence genes detected by PCR in strains of *Escherichia coli* isolated from urine, periurethra and perianal regions.

Virulence genes	1 st sampling			2 nd sampling			Total (n=69)
	UR (n=13)	PU (n=13)	PA (n=15)	UR (n=10)	PU (n=8)	PA (n=10)	
<i>fimH</i>	13 (100%)	13 (100%)	15 (100%)	10 (100%)	8 (100%)	10 (100%)	69 (100%)
<i>papC</i>	2 (15,4%)	3 (23,1%)	2 (13,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (10,1%)
<i>papG</i>	2 (15,4%)	3 (23,1%)	2 (13,3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	9 (13%)
<i>tsh</i>	2 (15,4%)	2 (15,4%)	1 (6,7%)	2 (20%)	1 (12,5%)	0 (0%)	8 (11,6%)
<i>fyuA</i>	12 (92,3%)	13 (100%)	15 (100%)	9 (90%)	8 (100%)	9 (90%)	66 (95,6%)
<i>iutA</i>	10 (76,9%)	13 (100%)	15 (100%)	8 (80%)	8 (100%)	9 (90%)	63 (91,3%)
<i>cvaC</i>	2 (15,4%)	2 (15,4%)	4 (26,7%)	2 (20%)	4 (50%)	4 (40%)	18 (26,1%)
<i>iss</i>	3 (23,1%)	5 (38,5%)	7 (46,7%)	3 (30%)	4 (50%)	4 (40%)	27 (39,1%)
<i>hlyA</i>	4 (30,8%)	6 (46,1%)	5 (33,3%)	3 (30%)	4 (50%)	3 (30%)	25 (36,2%)

<i>cnf1</i>	7 (53,8%)	8 (61,5%)	7 (46,7%)	5 (50%)	7 (87,5%)	5 (50%)	39 (56,5%)
Phylogenetic groups							
A	2 (15,4%)	1 (7,7%)	4 (26,7%)	1 (10%)	0	3 (30%)	11 (15,95%)
B1	1 (7,7%)	1 (7,7%)	2 (13,3%)	3 (30%)	3 (37,5%)	1 (10%)	11 (15,95%)
B2	4 (30,8%)	6 (46,1%)	4 (26,7%)	4 (40%)	5 (62,5%)	3 (30%)	26 (37,7%)
D	6 (46,1%)	5 (38,5%)	5 (33,3%)	2 (20%)	0	3 (30%)	21 (30,4%)

UR= urine, PU= periurethral region, PA= perianal region.

The distribution of the 10 virulence genes among the four phylogenetic groups was examined (Table 4).

Table 4. Distribution of virulence genes among phylogenetic groups.

Virulence genes	Phylogenetic groups			
	A (n=11)	B1 (n=11)	B2 (n=26)	D (n=21)
<i>fimH</i>	11 (100%)	11 (100%)	26 (100%)	21 (100%)
<i>papC</i>	0 (0%)	0 (0%)	3 (11,5%)	4 (19,0%)
<i>papG</i>	1 (9,1%)	0 (0%)	3 (11,5%)	5 (23,8%)
<i>tsh</i>	0 (0%)	0 (0%)	3 (11,5%)	5 (23,8%)
<i>fyuA</i>	10 (90,9%)	10 (90,9%)	26 (100%)	20 (95,2%)
<i>iutA</i>	9 (81,8%)	10 (90,9%)	26 (100%)	18 (85,7%)
<i>cvaC</i>	3 (27,3%)	4 (36,4%)	9 (34,6%)	2 (9,5%)
<i>iss</i>	3 (27,3%)	4 (36,4%)	11 (42,3%)	9 (42,8%)
<i>hlyA</i>	1 (9,1%)	0 (0%)	20 (76,9%)	4 (19,0%)
<i>cnf1</i>	5 (45,4%)	6 (54,5%)	21 (80,8%)	7 (33,3%)

The various virulence genes studied exhibited distinctive associations with phylogenetic groups. Among the phylogenetic groups, three subgroups of associated virulence genes were apparent. The first subgroup included virulence genes *fimH*, *fyuA*, *iutA*, *cvaC* and *iss*, which did not present association with any of the groups and were scattered among the strains. A second subgroup included *papC*, *papG* and *tsh*, which were present only in phylogenetic groups B2 and D (with exception of 1-2ndPA that harbored *papG* and lacked *papC* and *tsh*, which was classified as A group). Groups B2 and D typically include uropathogenic strains, suggesting that these genes occur only in virulent strains. The third subgroup included those genes that were found in higher percentage in phylogenetic group B2, like *hlyA* and *cnf1*, what suggests that these genes confer a high virulence potential to strains carrying them, as group B2 is the most

implicated in extraintestinal infections. Hly determinant differed greatly in frequency between the pathogenic groups (B2 and D), being more associated with phylogenetic group B2 (76,9% vs. 19,0%, respectively), and was found outside the pathogenic groups in only one strain belonging to phylogenetic group A, encountered in perianal region of patient 34.

Genes that were absent from only few samples (*fyuA* and *iutA*) were never absent from phylogenetic group B2.

Virulence genotypes. The isolates differed greatly from one another based on the presence of virulence genes, so that the number of virulence genes found in each strain ranged from 1 to 8, performing twenty seven virulence genotypes among the strains (Table 5).

Table 5. Genes profiles found among *Escherichia coli* isolates.

Virulence Genotypes found (n of strains)	1 st sampling			2 nd sampling		
	UR	PU	PA	UR	PU	PA
<i>fimH</i> (1)	-	-	-	1	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> (4)	2	-	-	1	-	1
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>iutA</i> (13)	1	3	3	3	1	2
<i>fimH</i> / <i>iutA</i> / <i>cnf1</i> (1)	-	-	-	-	-	1
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>iutA</i> / <i>cnf1</i> (6)	2	1	1	-	2	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>papG</i> / <i>iutA</i> (1)	-	-	-	-	-	1
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>iutA</i> / <i>hlyA</i> (1)	-	-	1	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>papC</i> / <i>papG</i> (1)	1	-	-	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>cvaC</i> / <i>iutA</i> / <i>cnf1</i> (1)	1	-	-	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>iss</i> / <i>iutA</i> (3)	1	1	1	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>cvaC</i> / <i>iutA</i> (1)	-	-	1	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>papC</i> / <i>papG</i> / <i>iutA</i> (1)	-	1	-	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>iutA</i> / <i>hlyA</i> / <i>cnf1</i> (7)	2	1	-	2	1	1
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>cvaC</i> / <i>iss</i> / <i>iutA</i> (1)	-	-	1	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>cvaC</i> / <i>iss</i> / <i>iutA</i> / <i>hlyA</i> (3)	-	1	2	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>iss</i> / <i>iutA</i> / <i>hlyA</i> / <i>cnf1</i> (5)	-	-	2	1	1	1
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>cvaC</i> / <i>iss</i> / <i>iutA</i> / <i>cnf1</i> (1)	-	-	1	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>papC</i> / <i>papG</i> / <i>iutA</i> / <i>hlyA</i> (1)	-	1	-	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>papC</i> / <i>papG</i> / <i>iutA</i> / <i>cnf1</i> (2)	-	-	1	1	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>tsh</i> / <i>iss</i> / <i>iutA</i> / <i>cnf1</i> (1)	1	-	-	-	-	-
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>tsh</i> / <i>cvaC</i> / <i>iss</i> / <i>iutA</i> (1)	-	-	-	-	-	1
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>cvaC</i> / <i>iss</i> / <i>iutA</i> / <i>hlyA</i> / <i>cnf1</i> (4)	-	1	-	-	2	1
<i>fimH</i> / <i>fyuA</i> / <i>papC</i> / <i>papG</i> / <i>iutA</i> / <i>hlyA</i> / <i>cnf1</i> (2)	-	1	1	-	-	-

<i>fimH / fyuA / tsh / iss / iutA / hlyA / cnf1</i> (2)	1	1	-	-	-	-
<i>fimH / fyuA / papG / cvaC / iss / iutA / cnf1</i> (1)	-	-	-	-	-	1
<i>fimH / fyuA / papC / papG / iss / iutA / hlyA / cnf-1</i> (1)	1	-	-	-	-	-
<i>fimH / fyuA / tsh / coN / iss / iutA / hlyA / cnf-1</i> (3)	-	1	-	1	1	-

UR= urine, PU= periurethral region, PA= perianal region.

The profile *fimH / fyuA / iutA* was the most frequent, occurring in 13 strains. We observed a predominance of strains harboring several virulence genes in phylogenetic groups B2 and D, mainly in B2 group. This finding suggests that strains belonging to these groups harbor more traits which confer virulence potential to the strains.

Four strains harbored 8 different virulence genes each, and were classified as belonging to phylogenetic group B2. Nine strains presented combinations of 7 virulence genes simultaneously, 6 of them were classified as belonging to phylogenetic group B2 and 3 as group D. Fourteen strains harbored 6 different virulence genes, and were scattered among the phylogenetic groups. A combination of five genes occurred in nine strains, 7 of which belonged to B2 group and 1 to D group. Strains harboring 4 virulence factor genes showed a predominant classification in phylogenetic groups B2 and D (9 of 14).

Fourteen strains harbored 3 virulence genes, and showed no predominance in any phylogenetic group or site of isolation. Genotypic profile harboring 2 virulence genes occurred in 4 strains, 2 of them were classified as A and 2 as D.

One strain harbored only *fimH* gene (present in 100% of the samples), this strain was classified as belonging to B1 phylogenetic group and was isolated from urine of a UTI case (2nd sampling).

BOXA1R. *BOXA1R* analysis was used to further examine the genetic similarities of isolates within each patient. It was possible to observe that, in most of the cases, strains present in periurethra belong to the same clone of the urinary strains, showing that the colonization of this region is a source for bacteria to enter into the bladder, and therefore bacteria able to colonize urine may be also able to colonize periurethral region. Strains from the periurethra often were identical to the isolated from perianal region, confirming that this colonization generally begins with bacteria present in the normal microbiota of the patient's intestine (Figure 2).

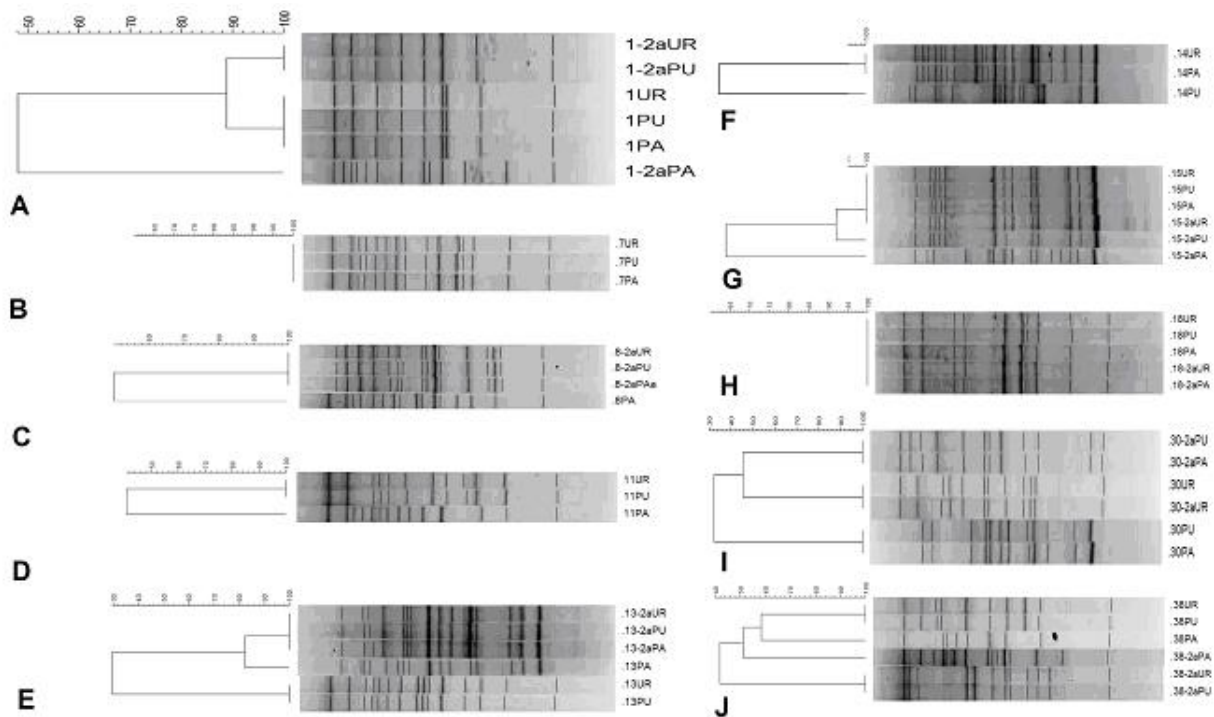


Fig. 2. Band patterns observed by *BOXA1R* technique. A: patient 1, B: patient 7, C: patient 8, D: patient 11, E: patient 13, F: patient 14, G: patient: 15, H: patient 18, I: patient 30, J: patient 38.

DISCUSSION

In this study we analyzed the presence of several properties, such as determinants for virulence factors and antimicrobial resistance in a collection of 69 *E. coli* strains isolated from urine and periurethral and perianal regions of 16 children with neurogenic bladder.

It was observed some inconsistency between the presence of virulence genes or phylogenetic groups and clonality. The virulence genes that showed discrepant results have been encountered both in plasmids or in chromosomal DNA (with the exception of *cnf1*), suggesting that either BOXA1R may not amplify plasmidial DNA or a fail of the technique to demonstrate small variations in the chromosome.

Drug resistance was found in 76,8% of the isolates; this high frequency of resistance may be due to the selection exerted by the pressure of prophylactic antibiotic use in these patients. It was observed a great number of strains resistant to cotrimoxazol (sulfamethoxazole plus trimethoprim), which was present in 33 of the 53 resistant strains, and associated with at least another drug in 13 strains. That is a concerning result, since cotrimoxazole is one of the major antibiotics used for the treatment of these patients. Resistance did not show correlation with any of the sites or condition of isolation (1st or 2nd sampling), and resistant strains were carried by these patients also in their normal intestinal microbiota.

The presence of virulence factors, as observed for drug resistance, showed no correlation to the sites or conditions of isolation. However, some results are worthy to argue.

All of the studied strains harbored *fimH* gene. This finding is consistent with that described by Johnson & Stell (2000), who also found *fimH* present in 100% of urosepsis

strains. Hull et al. (1998) demonstrated a frequency of 96% of strains carrying determinants for type 1 pili in *E. coli* isolates from asymptomatic bacteriuria and UTI in patients with spinal cord injuries. Other studies showed a similar high percentage of this gene in ExPEC isolates (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005; YAMAMOTO, 2007). *fimH* is responsible for coding adhesin subunit of type 1 fimbriae, which has been stated by many authors to be an important trait for adhesion and invasion of uroepithelial cells, mainly the bladder (OELSCHLAEGER et al., 2002; JUSTICE et al., 2004; MYSOREKAR et al., 2006). According to Johnson (1991) and Yamamoto (2007), type 1 fimbria is the most encountered virulence factors either in ExPEC or commensal strains, demonstrating the dissemination of this virulence factor among *Escherichia coli*. *E. coli* strains isolated from urine and periurethral region of children with neurogenic bladder studied by Schlager et al. (2000) demonstrated 100% of expression of type 1 fimbriae, independently of the site of isolation and whether symptoms were present or not. This finding led the authors to propose that type 1 fimbriae may be a marker for colonization but not infection of the abnormal urinary tract.

P fimbriae are adhesins primarily associated with strains that cause pyelonephritis, and recognize Gal(α 1-4)Gal residues present in membrane glycolipids of human uroepithelial cells, predominantly in renal tissue (JOHNSON, 1991). Genes encoding for P fimbriae were present in low percentage (10,1% *papC* and 13% *papG*), always associated with phylogenetic groups B2 or D, considered as pathogenic groups. This finding agrees with the fact that P fimbriae are associated primarily with UPEC strains and are not found in nonpathogenic strains (SALYERS & WHITT, 2001). This low percentage of strains harboring P fimbriae determinants may be due to the fact, proposed by other authors, that requirement for these fimbriae is decreased in isolates

from patients with compromising condition, such as urinary tract abnormalities (SANDBERG et al., 1988; JOHNSON, 1991).

These findings suggest that P fimbria is not essential to bladder colonization and cystitis in patients with neurogenic bladder, since it was found in few strains and never associated to UTI.

Tsh is an autotransporter protein primarily described in APEC strains which presents adhesive and proteolytic properties, exhibiting a mucinolytic function (KOBAYASHI et al., 2007). All the isolates harboring *tsh* were assigned into B2 or D groups, suggesting that this gene is not very common in nonpathogenic or commensal strains. Two patients carried strains harboring *tsh*, and the presence of these strains in urine was associated with both asymptomatic bacteriuria and UTI; both patients also presented periurethral colonization by these strains. In one of these patients (patient 30), the same clone was encountered in both urine samples. These findings suggest that this protein could help for long-term colonization. The gene *tsh* was found in UPEC strains with greater frequencies (11,6% in this study vs. 63% vs. 39,5%) in others studies (HEIMER et al., 2004; RODRIGUEZ-SIEK, 2005), although its real function in UTI is still unknown. Further studies with this protein in UPEC strains are necessary to determine its role in uropathogenicity.

Genes related to iron capture system were found in most of the isolates and comprises two of the most frequent genes. *fyuA* and *iutA* were the second and third most prevalent genes found in our strains, respectively (95,6% vs. 91,3%; all strains harbored *fimH*). Similar results were found by Johnson & Stell (2000), who verified 93% and 80% *fyuA* and *iutA*, respectively, in strains isolated from urosepsis. Bonacorsi et al. (2006) also found 96% and 84% prevalence of *fyuA* and *iutA* in UTI isolates. These

findings are expected since it has been demonstrated that genes encoding for iron acquisition systems are upregulated during urinary tract infections (SNYDER et al., 2004; ALTERI & MOBLEY, 2007), demonstrating that urine is an iron poor environment, and UPEC strains overcome this limiting condition by the production of iron acquisition systems.

Most of the isolates belonged to phylogenetic groups B2 or D (37,7% and 30,4%, respectively), although phylogenetic groups did not present a clear correlation with sites of isolation, with the exception of group A strains that, as expected, were more isolated from perianal region. In most of the cases when group D strains were present in urine, they were causing asymptomatic bacteriuria.

A study of Sabaté et al. (2006) indicated that *E. coli* from group B2 are uncommon among commensal intestinal microbiota, however, when present, they are highly virulent. In our study we observed that 15 (60%) of 25 perianal isolates were assigned into phylogenetic groups B2 and D (28% and 32%, respectively), suggesting intestinal microbiota as a potential source of virulent bacteria. A great carriage of pathogenic group's strains was also observed by ZHANG et al. (2002), who found 47,7% of fecal strains belonging to phylogenetic group B2 and 19,3% to group D.

It has been reported by Restieri et al. (2007) that strains belonging to phylogenetic groups A and B1 are nonpathogenic, and are rarely associated to extraintestinal infections, including urinary tract infection. However, in our study, two strains of group A and 1 strain of B1 were found causing asymptomatic bacteriuria, and one group A and three group B1 strains were isolated from UTI (2nd sampling).

In our study, strains belonging to the pathogenic phylogenetic groups often harbored more genetic determinants for virulence factors than groups A and B1, since

77% of strains harboring 7 or more virulence genes at once were assigned into B2 or D groups.

Strains belonging to phylogenetic groups B2 and D were responsible for 77% of asymptomatic bacteriuria cases and 60% of UTI cases, and B2 group had a predominance of five virulence genes (*papC*, *papG*, *tsh*, *hlyA* and *cnf1*) studied over groups A and B1. Our results are consistent with the previous evidence that *E. coli* phylogenetic group B2 predominates among UPEC and is the main repository of many extraintestinal virulence genes (PICARD et al., 1999; JOHNSON and STELL, 2000). Bielaszewska et al. (2007) also reported that about two thirds of the isolates from asymptomatic bacteriuria belonged to groups B2 and D, which typically include ExPEC.

It is interesting to observe that, in one patient (patient 6), *E. coli* belonging to B1 group and harboring only *fimH* of the studied virulence genes, was responsible for urinary tract infection. This finding indicates that, in neurogenic bladder patients, bacteria do not need to harbor several virulence genes to be able to cause urinary tract infections, and therefore changes in the host defense mechanisms may be more important in the establishment of a symptomatic infectious process than the presence of virulence factors. In fact, according to Johnson (1991), debilitating conditions in the host are associated with a decreased expression of virulence factors in strains causing UTI. Other studies in which the presence of virulence genes and/or the expression of virulence factors in isolates from patients with neurogenic bladder were analyzed led the authors to the same conclusion (SCHLAGER et al., 2000; GUIDONI et al., 2006).

We could not differentiate between fecal and urine strains in relation to virulence genes and phylogenetic groups, and the fecal origin of the strains encountered in periurethra and urine was proved in this study. This is in agreement with Triffilis et al.

(1994), who stated that *E. coli* from patients with acute pyelonephritis and abnormalities of the urinary tract are frequently indistinguishable from commensal fecal isolates.

Thus, as stated by Picard et al. (1999), the barrier between commensalism and virulence results from the complex balance between the status of the host and the presence and expression of virulence factors in the strain.

Our results demonstrated a great variability among the isolates, with 27 different virulence gene profiles being observed. Strains isolated from both asymptomatic bacteriuria and urinary tract infection (1st and 2nd sampling, respectively) did not present a defined pattern, differing greatly from each other. This finding is in agreement with Bielaszewska et al. (2007), who reported that UPEC genomes are extremely dynamic and differ considerably from each other due to horizontal gene transfers.

Many virulence factors are known to be associated with urinary tract infections, and bacteria are able to adapt to different environments, requiring different virulence genes in each situation. Thus, it is not surprising that the isolates differed from each other in relation to the virulence genes combinations presented.

The use of BOXA1R technique confirmed the hypothesis that the gastrointestinal tract is the source of bacteria responsible for urinary tract infections (SALYERS and WHITT, 1994; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005; YAMAMOTO, 2007), as demonstrated by similarities between strains isolated from perianal region and periurethra and/or urine. Our results suggest that the ability to colonize the periurethra is often decisive for the passage of intestinal strains to the bladder. In some cases we could observe that the same strain was responsible for asymptomatic bacteriuria and UTI in the same patient in different time points, finding that supports the idea that changes in host defenses are

more important than the presence of virulence factors to uropathogenicity in patients with neurogenic bladder.

Recurring UTIs by the same *E. coli* strain have been proposed to be due to the establishment of intracellular reservoirs of bacteria or biofilm formation in the bladder (JUSTICE et al., 2004; MYSOREKAR and HULTGREN, 2006; SOTO et al., 2006), and these two properties are attributed to type 1 fimbria. Moreover, the results found by Mysorekar et al. (2006) suggest a correlation between the increased formation of intracellular reservoirs and the presence of a damaged epithelium, which occurs in patients with spinal cord injury.

In conclusion, we suggest that strains causing asymptomatic bacteriuria or UTI in patients with neurogenic bladder do not differ from those found colonizing the periurethral and perianal regions in relation to their possession of virulence genes or phylogenetic groups. We suggest the importance of immune status of the host over the presence of virulence determinants in strains causing UTI and also confirmed the fecal-periurethral-bladder sequence of ascending urinary tract infections by BOX-PCR.

REFERENCES

- ALTERI, C. J., MOBLEY, H. L. T. (2007). Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infect. Immun.* 75:2679-2688.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; CHERRIS, J.C.; TURCK, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
- BIELASZEWSKA, M., DOBRINDT, U., GÄRTNER, J., GALLITZ, I., HACKER, J., KARCH, H., MÜLLER, D., SCHUBERT, S., SCHMIDT, M. A., SORSA, L. J., ZDZIARSKI, J. (2007). Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 297:625-639.

BONACORSI, S., HOUDOUIN, V., MARIANI-KURKDJIAN, P., MAHJOURB-MESSAI, F., BINGEN, E. (2006). Comparative prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* causing urinary tract infection in male with and without bacteremia. **J. Clin. Microbiol.** 44:1156-1158.

CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 4555-4558.

CLSI - MANUAL CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2005) Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana:15º Suplemento Informativo. Clin. Lab. Stand. Inst./NCCLS. M100-S15 Vol. 25 No. 1

DELICATO, E. R., BRITO, B. G., GAZIRI, L. C., VIDOTTO, M. C. (2003). Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Vet. Microbiol.** 94, 97-103.

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

GUIDONI, E. B. M., DALPRA, V. A., FIGUEIREDO, P. M., LEITE, D. S., MÍMICA, L. C., YANO, T., BLANCO, J. E., TOPOROVSKI, J. (2006). *E. coli* virulence factors in children with neurogenic bladder associated with bacteriuria. **Pediatr. Nephrol.** 21:376-381.

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. **Infect. Immun.** 72:593-597.

HULL, R. A., RUDY, D. C., WIESER, I. E., DONOVAN, W. H. (1998). Virulence factors of *Escherichia coli* isolates from patients with symptomatic and asymptomatic bacteriuria and neuropathic bladders due to spinal cord and brain injuries. **J. Clin. Microbiol.** 36:115-117.

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

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

JUSTICE, S. S., HUNG, C., THERIOT, J. A., FLETCHER, D. A., ANDERSON, G. G., FOOTER, M. J., HULTGREN, S. J. (2004). Differentiation and development pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. **PNAS.** 101: 1333-1338.

KASCHUK, G., HUNGRIA, M., ANDRADE, D. S., CAMPO, R. J. (2006). Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in southern Brazil. **Appl. Soil Ecol.** 32, 210-220.

- KOBAYASHI, R. K., GAZIRI, L. C., VENÂNCIO, E. J., VIDOTTO, M. C. (2007). Detection of Tsh protein mucinolytic activity by SDS-PAGE. **J. Microbiol. Methods.** 68: 654-655.
- KOUOKAM, J. C., WAI, S. N., FÄLLMAN, M., DOBRINDT, U., HACKER, J., UHLIN, B. E. (2006). Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 74:2022-2030.
- LE BOUGUENEC, C., ARCHAMBAUD, M., LABIGNE, A. (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 30, 1189-1.
- MAY, A. K., GLEASON, T. G., SAWYER, R. G., PRUETT, T. L. (2000). Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. **Infect. Immun.** 68:176-183.
- MYSOREKAR, I. U., HULTGREN, S. J. (2006). Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. **PNAS.** 103:14170-14175.
- OELSCHLAEGER, T. A., DOBRINDT, U., HACKER, J. (2002). Virulence factors of uropathogens. **Curr. Opin. Urol.** 12:33-38.
- PICARD, B., GARCIA, J. S., GOURIOU, S., DURIEZ, P., BRAHIMI, N., BINGEN, E., ELION, J., DENAMUR, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.** 67:546-553.
- RESTIERI, C., GARRISS, G., LOCAS, M. C., DOZOIS, C. M. (2007). Autotransporter-Encoding Sequences Are Phylogenetically Distributed among *Escherichia coli* Clinical Isolates and Reference Strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 73:1553-1562.
- RODRIGUEZ-SIEK, K. E., GIDDINGS, C. W., DOETKOTT, C., JOHNSON, T. J., FAKHR, M. K., NOLAN, L. K. (2005). Comparison of *Escherichia coli* implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology.** 151:2097-2110.
- ROOS, V., ULETT, G. C., SCHEMBRI, M. A., KLEMM, P. (2006). The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. **Infect. Immun.** 74:615-624.
- SABATÉ, M., MORENO, E., PÉREZ, T., ANDREU, A., PRATS, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clin Microbiol Infect.** 12:880-886.
- SALYERS, A. A., WHITT, D. D. (2001). *Escherichia coli* extraintestinal infections. In Bacterial pathogenesis - A molecular approach. 2nd. ed. Washington, D.C.: ASM Press. p. 422-436.
- SANDBERG, T., KAIJSER, B., LIDIN-JANSON, G., LINCLON, K., ORSKOV, F., ORSKOV, I., STOKLAND, E., SVANBORG-EDÉNS, C. (1988). Virulence of *Escherichia coli* in relation to host factors in women with symptomatic urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.** 26:1471-1476.

SCHLAGER, T. A., WHITTAM, T. S., HENDLEY, J. O., WILSON, R. A., BHANG, J., GRADY, R., STAPLETON, A. (2000). Expression of virulence factors among *Escherichia coli* isolated from the periurethra and urine of children with neurogenic bladder on intermittent catheterization. ***Pediatr. Infect. Dis J.*** 19:37–41.

SNEATH, P. B. A., SOKAL, R. R. (1973). Numerical Taxonomy- the Principles and Practice of Numeral Classification. W.H. Freeman, San Francisco, 573 pp. 193.

SNYDER, J. A., HAUGEN, B. J., BUCKLES, E. L., LOCKATELL, C. V., JOHNSON, D. E., DONNENBERG, M. S., WELCH, R. A., MOBLEY, H. L. T. (2004). Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. ***Infect. Immun.*** 72:6373-6381.

SOTO, S. M., SMITHSON, A., HORCAJADA, J. P., MENSA, J. P., VILA, J. (2006). Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. ***Clin Microbiol Infect.*** 12:1034-1036.

TOLEDO, M.R.F., FONTES, C.F., TRABULSI, L.R. (1982_a) EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, uréase e triptofano-desaminase. ***Rev. Microbiol.*** 13, 309-315.

TOLEDO, M.R.F., FONTES, C.F., TRABULSI, L.R. (1982_b) MILi: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. ***Rev. Microbiol.*** 13, 230-235.

TRIFILLIS, A. L., DONNENBERG, M. S., CUI, X., RUSSELL, R. G., UTSALO, S. J., MOBLEY, H. L. T., WARREN, J. W. (1994). Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. ***Kidney International.*** 46:1083-1091.

VERSALOVIC, J., SCHNEID, M., BRUJIN, F. J., LUPSKI, J. R (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. ***Methods Mol. Cell Biol.*** 5,25–40.

YAMAMOTO, S. (2007). Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. ***J. Infect. Chemother.*** 13:68-73.