



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANGÉLICA MARIM LOPES

PESQUISA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL (ExPEC) EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE CONSUMO NO MUNICÍPIO DE LONDRINA – PARANÁ

ANGÉLICA MARIM LOPES

PESQUISA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL (ExPEC) EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE CONSUMO NO MUNICÍPIO DE LONDRINA – PARANÁ

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo.

Londrina
2019

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

L864p Lopes, Angélica Marim.

Pesquisa de fatores de virulência de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) em amostras de águas de consumo no município de Londrina – Paraná. / Angélica Marim Lopes. - Londrina, 2019.
68 f.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Contaminação da água - Tese. 2. *Escherichia coli* patogênica extraintestinal - Tese. 3. Doenças - Tese. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

ANGÉLICA MARIM LOPES

PESQUISA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA EXTRAINTESTINAL (ExPEC) EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE CONSUMO NO MUNICÍPIO DE LONDRINA – PARANÁ

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^a. Dr^a. Renata K. T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Tatiane das Neves Burgos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Daniele Zendrini Rechenchoski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de outubro de 2019.

Dedico este trabalho aos *meus pais Carlos e Elizabete*, aos *meus irmãos Jéssica e Vinícius*, aos *meus avôs Francisco (in memorian) e Liberata* e a *toda minha família que, com muito amor, me apoiaram nessa longa jornada, me ajudaram a construir o que sou e a concretizar mais uma etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela força, fé, sabedoria e pela sua presença constante em minha vida, o que foi fundamental não somente na realização deste trabalho, mas em todas as conquistas pessoais e profissionais.

Aos meus pais Elizabete e Carlos, por tudo que me ensinaram, pelo exemplo de vida, apoio incondicional e oportunidade de poder concretizar um sonho.

Aos meus irmãos Jéssica e Vinícius, pela paciência, por permanecerem sempre ao meu lado nas dificuldades independente da distância e me incentivarem a continuar nessa jornada.

A minha vó Liberata, que com toda sua experiência nunca me deixou desistir diante dos meus fracasso e a toda minha família pelo amor e carinho.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Jacinta Sanchez Pelayo pela ajuda, conhecimentos transmitidos, disponibilidade, acolhida, conselhos, mas sobretudo pela sua amizade, seu carinho e sua dedicação, ao longo destes anos, que são sentimentos que ficarão eternamente em meu coração.

As grandes amigas Ilmara, Mayara, Mariana, Tamara, Camila e a todos os amigos pela grande e indispensável ajuda, amizade, companheirismo, conselhos, motivação, momentos de risadas, e em especial pela forte presença e carinho ao longo destes anos.

À amiga Daniele, pela forte presença ao longo desses anos em quase todos os momentos de minha vida e pelo seu carinho para comigo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha e colegas de laboratório Claci, Anahí, Matheus, Kawana e Caroline pela colaboração em meus experimentos e momentos de alegria.

À Prof^a. Dr^a. Eliana Carolina Vespero, Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Prof^a. Dr^a. Daniele Zendrini Rechenchoski Prof^a. Dr^a. Tatiane das Neves Burgos, por aceitar serem membros da minha banca de defesa da tese, pela contribuição e ajuda inestimável.

Ao Laboratório de Virologia da UEL pelo forneciemnto de cultivo de células e a todos os colegas e funcionários da Vigilância de Saúde pela colaboração na coleta de material para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para meu crescimento e para a realização deste trabalho. **MUITO OBRIGADA!**

*“Três coisas nas quais acredito:
a paz do dever cumprido, a saudade do amor
perdido e a esperança do recomeçar”.*

LOPES, Angélica Marim. **Pesquisa de fatores de virulência de *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC) em amostras de águas de consumo no município de Londrina – Paraná.** 2019. 68 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A contaminação de água e alimentos com bactérias fecais permanece um problema comum e persistente, impactando a saúde pública e econômica do mundo todo. Dessa forma, a água é considerada um importante meio de transmissão de enfermidades ao ser humano e animais, sendo a *Escherichia coli* de grande importância, especialmente o grupo de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). A capacidade deste grupo de causar infecções nos homens e nos animais, está associada a presença de diferentes fatores de virulência que as caracterizam como patogênicas. Diante disso, fez-se a necessidade de realizar uma pesquisa, a fim de verificar se a água é uma fonte potencial de ExPEC, através de marcadores moleculares específicos para identificação deste grupo. Os genes de virulência de ExPEC pesquisados neste estudo foram determinados utilizando a técnica da PCR. O ensaio de aderência em células HEP-2 e biofilme foi realizado em todas as amostras que apresentaram algum gene característico de ExPEC. Das 750 amostras de água coletadas 250 (33,3%) estavam contaminadas com *E. coli*. Do total de 250 amostras, 75,2% apresentaram algum gene relacionado a ExPEC, sendo que 17,5% foram positivas para os fatores de virulência que caracterizam APEC (*iutA*, *iroN*, *hlyF*, *iss* e *ompT*). Os genes mais prevalentes foram *fimH* e *fyuA*, sendo identificados em 62,8% e 59,8% dos isolados, respectivamente. Os genes *iutA* e *traT* também apresentaram alta frequência, sendo detectados em 57,4% e 52,1% dos isolados, respectivamente. Os genes *iroN*, *papC*, *papG*, *ompT*, *ibeA*, *iss*, *sitA*, *hlyF*, *cnf1* e *cnf2* foram encontrados com frequência menor que 20%. O *hlyA* e *sfa/focDE* foram os genes menos prevalentes neste estudo, ambos detectados em apenas 5,3% dos isolados, seguidos pelo gene *tsh* (1,2%). Não foram detectados os genes *afa/draBC* e *kpsMT K1*. Na análise filogenética as amostras pesquisadas pertenceram principalmente ao filogrupo B2. Entre os padrões de adesão pesquisados em cultura de células HEP-2 o padrão agregativo foi predominante nestas amostras. No teste de formação de biofilme as amostras positivas para ExPEC foram classificadas em dois grupos com base em seus valores de absorvância: grupo 1 ($OD_{570} > 0,2$) 142 amostras e grupo 2 ($OD_{570} \leq 0,2$) com 46 amostras. Assim, foi possível demonstrar que ExPEC são patógenos importantes na contaminação da água para consumo humano e compreender melhor as implicações que esse reservatório pode trazer para a saúde pública e por meio desses resultados melhorar a qualidade microbiológica da água.

Palavras-chave: água; ExPEC; virulência; doença; genes.

LOPES, Angélica Marim. **Research on Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* virulence factors (ExPEC) in drinking water samples in Londrina - Paraná.** 2019. 68 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The water and food contamination with fecal bacteria remains a common and persistent issue, impacting the public health and economy all around the world. This way, the water is considered an important transmission medium of diseases to human being and animals, being of huge importance Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC). The capability of this group to cause infections in men and animals is associated with the presence of different virulence factors which characterized them as pathogenic. Accordingly, it is necessary to realize a research in order to verify if the water is a potential source of ExPEC, through specific molecular markers to identify this group. The ExPEC virulence genes searched in this study were determined using the PCR technique. Adhesion test in HEP-2 cells and biofilm were realized in positive samples for some genes of ExPEC. From the 750 water samples collected, 250 (33.3%) were contaminated with *E. coli*. This way, from the 250 total samples, 33 (13.2%) were positive for virulence factors that characterize APEC (*iutA*, *iroN*, *hlyF*, *iss* and *ompT*). The most prevalent genes were *fimH* and *fyuA*, being identified 62.8% and 59,8% of isolates, respectively. The genes *iutA* and *traT* also presented high frequency, being detected in 57.4% and 52.1% of isolates, respectively. As much *iroN*, *papC*, *papG*, *ompT*, *ibeA*, *iss*, *hlyF*, *cnf1* and *cnf2* were found with frequency lower than 20%. The *hlyA*, *sfa/focDE* were both detected in only 5.2% of the isolates, *sitAin* 6.2% of realized analyses, being the gene lower prevalent *tsh* (1.2%). It were not detected the genes *afa/draBC* e *kpsMT K1*. Among the main phylogenetic groups were predominant groups B2. Between the searched aggregative standards in cell culture HEP-2, the aggregative standards were predominant on these samples. In the biofilm formation test the samples were classified in two groups based on their values of absorbance: group 1: ($OD_{570} > 0,2$) with 142 samples and group 2 ($OD_{570} \leq 0,2$) with 46 samples. Thus, it was possible to demonstrate that ExPEC are important pathogens on water contamination for human consumption and better understand the implications which this reservoir can bring to public health and, through these results, improve the water microbiological quality.

Key words: water; ExPEC; virulence; disease; genes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais fatores de virulência de ExPEC	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarréiogênica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfato
EAEC	<i>Escherichia coli</i> agregativa
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
IAP	Instituto Ambiental do Paraná
ITU	Infecção do Trato Urinário
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
MiLi	Motilidade Indol Lisina
EPM	Escola Paulista de Medicina (teste bioquímico)
MNEC	<i>Escherichia coli</i> associada a meningite neonatal
NBR	Norma Brasileira
nM	Nanomoles
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomoles
SANEPAR	Companhia de Saneamento do Paraná
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> associadas a sepse
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
USA	Estados Unidos da América
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA.....	14
2.2	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Extraintestinal (ExPEC)	16
2.3	Fatores de virulência de ExPEC.....	21
2.3.1	Adesinas	23
2.3.2	Sistemas de Aquisição de Ferro.....	26
2.3.3	Toxinas e Proteases.....	29
2.3.4	Resistência Sérica.....	31
3	REFERÊNCIAS	34
4	ARTIGO CIENTÍFICO	48
5	CONCLUSÃO	68

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de água e alimentos com bactérias fecais é um problema comum e persistente, impactando a saúde pública e a economia do mundo (CABRAL, 2010). As doenças relacionadas à água são as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (PRÜSS-USTÜN *et al.*, 2014; PYNEGAR *et al.*, 2018). Entre estas, as doenças diarreicas causadas principalmente por bactérias e vírus, são estimadas em causar todos os anos 361 mil mortes de crianças com menos de cinco anos, em especial em países em desenvolvimento (WHO, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) determina que a segurança da água para o consumo humano deve atender às condições físicas, microbiológicas, químicas e radioativas. Para o parâmetro microbiológico, a água deve estar livre de qualquer microrganismo que possa afetar a saúde. Uma maneira de verificar a qualidade microbiológica da água é realizar o monitoramento da bactéria *Escherichia coli* considerada o principal indicador fecal (RIOS *et al.*, 2017; BIRAWIDA *et al.*, 2018).

Algumas cepas de *E. coli* são conhecidas como patógenos intestinais e outras podem, oportunisticamente, causar infecções extraintestinais, particularmente do trato urinário (JOHNSON, 2011; FREITAS *et al.*, 2016). Assim, *E. coli* patogênica foi classificada em dois grandes grupos: as que possuem seu mecanismo de patogenicidade estabelecido no intestino e são agrupadas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e as que apresentam capacidade de colonizar e disseminar para outras regiões do corpo identificadas como *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008; PITOUT, 2012).

A capacidade da *E. coli* de causar infecções nos homens e nos animais está associada a presença de diferentes fatores de virulência que a caracteriza como patogênica. Os mecanismos associados à virulência incluem uma variedade de adesinas, sistemas de captação de ferro, toxinas, fatores de resistência sérica e invasão celular. As cepas patogênicas extraintestinais, como *E. coli* uropatogênica (UPEC), também diferem de cepas comensais por pertencerem em sua maioria ao grupo filogenético B2, caracterizado por incluir cepas mais virulentas. Assim, a presença desse grupo de *E. coli* em água pode ser um potencial problema de saúde para a população (RILEY, 2014; CUNHA *et al.*, 2017).

Os atributos genéticos dos isolados de *E. coli* podem fornecer informações valiosas sobre seu nicho ecológico e potencial para causar doença. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente isolados de *E. coli* obtidos a partir de amostras de água para consumo humano do município de Londrina na região norte do Paraná, sendo que os objetivos específicos compreenderam detectar os genes associados a fatores de virulência de ExPEC, através da PCR; caracterizar o padrão de adesão em células HEp-2; detectar a formação de biofilme e realizar a filogenia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA

A água é essencial para várias atividades, dentre as quais se destacam o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação. O crescimento populacional e a expansão industrial trouxeram como consequência o comprometimento das águas dos rios, lagos e reservatórios, sendo estes afetados pelos mais variados tipos de poluentes (CABRAL, 2010). Os principais agentes patogênicos vinculados à água são: bactérias entéricas (*Escherichia coli* diarreiogênica, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp.), vírus (norovírus e hepatite A) e protozoários (*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.) (ISHII; SADOWSKY, 2008). Dessa forma, a água é considerada um importante veículo de transmissão de patógenos para o ser humano, sendo a *E. coli* de grande importância clínica, o que torna primordial a avaliação da qualidade microbiológica da água de consumo (CABRAL, 2010; EBOMAH; ADEFISOYE; OKOH, 2018).

A bactéria *E. coli* foi descrita primeiramente em 1885, pelo bacteriologista alemão Theodore Escherich, sendo naquela ocasião denominada como "*Bacterium coli comune*". *E. coli* é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, constituinte da microbiota intestinal do homem e dos animais de sangue quente, sendo a espécie comensal predominante nestes (CROXEN *et al.*, 2013).

No entanto, determinadas cepas de *E. coli* são reconhecidamente patogênicas devido à presença de um ou mais genes de virulência encontrados em elementos genéticos, como plasmídeos, bacteriófagos, ilhas de patogenicidade e transposons, o que lhes permitem causar vários quadros patológicos (CROXEN *et al.*, 2013).

As estações de tratamento de águas residuais são os principais reservatórios de microrganismos como as bactérias. As condições de operação, incluindo alta carga de nutrientes, temperatura ideal e altas concentrações microbianas, criam condições favoráveis à transferência de genes entre bactérias e estimulam o desenvolvimento de novas combinações de genes e disseminação de

cepas mais virulentas (SCALETSKY *et al.*, 2012). Uma quantidade significativa de bactérias são eliminadas durante o tratamento de águas residuais (OSIŃSKA *et al.*, 2018), incluindo bactérias que abrigam resistência a drogas e genes de virulência, são lançados novamente no ambiente, como em grandes lagos e rios (FRIGON *et al.*, 2013; CARRILLO; DURÁN, 2019).

A virulência da bactéria *E. coli* é determinada principalmente por fatores localizados em elementos genéticos móveis e propagação por transferência horizontal de genes codificados por cromossomos ou DNA plasmidial (MOKRACKA; KOCZURA; KAZNOWSKI, 2012; KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013; OSIŃSKA *et al.*, 2018). Pelo menos 567 genes de virulência foram identificados em *E. coli*. Dessa forma, o exame bacteriológico da água tem um papel importante nos estudos de poluição, pois é uma medida direta do efeito deletério da poluição na saúde humana (YATES, 2007; SINGH *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2017)

O Instituto Ambiental do Paraná (IAP) realizou a análise da água que abastece a cidade de Londrina e região, no período de abril de 2010 a dezembro de 2011, levando-se em consideração os limites estabelecidos na Resolução Nº 357/05 do CONAMA para rios de classe “2” na qual os rios monitorados estão enquadrados. As variáveis que apresentaram maior número de violações em relação ao número de amostras coletadas foram: fenóis totais (32 violações/40 amostras); cobre dissolvido (22 violações/45 amostras); *E. coli* (18 violações/34 amostras); e fósforo total (11 violações/45 amostras) (IAP, 2012). No entanto, relatório gerado em junho de 2019 pela empresa SANEPAR, responsável pelo controle e distribuição da água tratada da cidade de Londrina, demonstra amostras livres de qualquer contaminante, inclusive microbiológico. A contaminação por *E. coli* é um problema sério para quase todos os tipos de reservatórios de água no ambiente, tornando essencial o seu reconhecimento e entendimento.

A descarga direta do escoamento de águas pluviais em águas costeiras, através de tempestades nos sistemas de drenagem, pode causar contaminação por patógenos de, aproximadamente, 16% das entradas totais de coliformes fecais. Além disso, os rios costeiros que drenam bacias hidrográficas pouco desenvolvidas, com extensas áreas úmidas ribeirinhas, podem ser uma fonte natural de patógenos fecais para as águas costeiras (PANDEY *et al.*, 2014).

Fossas sépticas também podem contribuir com quantidades significativas de patógenos fecais nas águas costeiras e poços artesianos onde

solos saturados aumentam o crescimento de patógenos. A quantidade de influxos de patógenos provenientes principalmente de rios, lagos e reservatórios durante a estação chuvosa é de particular importância na determinação do transporte e distribuição de *E. coli* (KISTEMANN *et al.*, 2002; PANDEY *et al.*, 2014).

2.2 *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA EXTRAIESTINAL (ExPEC)

A partir de modificações genéticas durante a evolução de seus diferentes clones, as cepas de *E. coli* foram classificadas em dois grupos: as relacionadas às manifestações clínicas entéricas, denominadas *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e as associadas às infecções extraintestinais (ExPEC), constituídas por cepas capazes de se disseminar na corrente sanguínea, sistema nervoso e trato urinário, onde desenvolvem infecções com diferentes níveis de gravidade (OLIVEIRA; PALUDO; AREND, 2011).

No trato gastrointestinal ExPEC são constituintes da microbiota normal, ou seja, elas colonizam o intestino sem causar infecção (JOHNSON; RUSSO, 2005). Apesar da capacidade de colonização prolongada e assintomática nos seres humanos, ExPEC são capazes de causar doenças somente quando saem do intestino, causando infecções em diversos locais (BERMAN *et al.*, 2014).

A denominação ExPEC foi proposta por Russo e Johnson (2000) como uma forma de abranger todas as amostras de *E. coli* isoladas de infecções extraintestinais, independentemente do hospedeiro e do sítio de isolamento. Desta forma, as amostras isoladas de infecção urinária são conhecidas como *E. coli* uropatogênica (UPEC), as isoladas de meningite como *E. coli* associada a meningite neonatal (MNEC), *E. coli* associadas a sepse (SEPEC) e também as amostras isoladas de infecções em aves, denominadas (APEC). Clermont *et al.* (2013) classificaram as amostras de *E. coli* em sete principais grupos, A, B1, B2, C, D, E e F. A distribuição em grupos filogenéticos tem sido utilizada como uma maneira rápida e simples de classificar cepas de *E. coli* patogênicas, além de contribuir para o entendimento de como os genes de virulência são adquiridos. ExPEC pertencem principalmente ao grupo filogenético B2 e em menor frequência ao grupo D (BÉLANGER *et al.*, 2011; MELLATA, 2013).

Em humanos, ExPEC podem ocorrer em todos os grupos etários e acometer diversos órgãos, sendo responsáveis por importantes quadros patológicos

como sepse, meningite neonatal, bacteremia, osteomielite, celulite, cistite, pielonefrite e prostatite (SANTOS *et al.*, 2009; BÉLANGER *et al.*, 2011; PITOUT, 2012). Em termos de morbidade e mortalidade, ExPEC tem um grande impacto sobre a saúde pública com um custo econômico anual de bilhões de dólares (RUSSO; JOHNSON, 2003). Vale ressaltar sua grande importância no ambiente hospitalar, onde acometem pacientes já debilitados e imunologicamente deprimidos, e assim estarão associadas à aquisição de novos e preocupantes genes de resistência a antibióticos (KUMARASAMY *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2016).

Apesar de sua enorme relevância, houve uma intensificação nos estudos de marcadores genéticos de virulência, com o objetivo de caracterizar melhor seus mecanismos de virulência (EWERS *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009). Entre os principais fatores de virulência apresentados por ExPEC podemos citar as adesinas, invasinas, toxinas, cápsula, mecanismos de resistência sérica e sistemas de captação de ferro (SCHOUWER *et al.*, 2012).

A incidência de doenças associadas a ExPEC aumenta com a idade dos pacientes, e assim, o aumento na população idosa em todo o mundo indica que pode haver um correspondente aumento da incidência das doenças extraintestinais induzidas por *E. coli* (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007). A identificação de reservatórios relevantes e vias de transmissão para ExPEC podem evitar que indivíduos vulneráveis sejam expostos a esta bactéria (JOHNSON; RUSSO, 2002).

Estudos epidemiológicos e moleculares identificaram vários reservatórios em potencial, como o próprio trato intestinal humano, além de reservatórios animais, esgoto e fontes ambientais como a água (MANGES; JOHNSON, 2012). Em um estudo conduzido na França por Diallo *et al.* (2013), onde analisaram amostras de água de uma estação de tratamento de águas residuais, entre as cepas de *E. coli* investigadas, a mais prevalente foi ExPEC. Na Austrália, Masters *et al.* (2011), pesquisando genes de virulência de ExPEC em água doce, detectaram a presença de *E. coli* com características genotípicas de ExPEC. Hamelin *et al.* (2006), também detectaram a presença de ExPEC em sistemas aquáticos de dois rios localizados no Canadá. No Brasil, são poucos os trabalhos que relacionam os prováveis reservatórios associados com ExPEC, principalmente em água para consumo humano. Assim, são necessários mais estudos a fim de compreender as implicações desses patógenos na saúde pública.

A transmissão das ExPEC não ocorre apenas de humano para humano, mas também de animais para humanos, e vice-versa, seja por contato direto ou indireto (SILVA; MENDONÇA, 2012). Este fato foi observado em bactérias isoladas de aves e mamíferos, que aparentemente não foram expostos a antibióticos, porém apresentaram multirresistência (COSTA; LOUREIRO; MATOS, 2013).

Dentro do grupo das ExPEC, as UPECs, são compreendidas como *E. coli* que desviam seu estado comensal e assumem o seu estado de cepa patogênica, causando especialmente infecções do trato urinário (ITU) (RAMOS *et al.*, 2011; GIBREEL *et al.*, 2011). A habilidade das UPECs em causar infecções urinárias recorrentes sugere a presença de fatores de virulência que permitem a colonização e a permanência desta bactéria no trato urinário (RAMOS *et al.*, 2011; GIBREEL *et al.*, 2011).

As ITU apresentam alta morbidade, tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, e resultam em altos custos econômicos e diminuição da produtividade de trabalho (BRUMBAUGH; MOBLEY, 2012). A UPEC tem a habilidade de colonizar o trato urinário, e até o momento, ITU estão entre as doenças bacterianas mais predominantes em humanos (BASU *et al.*, 2013). Cistite e pielonefrite são formas crônicas da doença e têm sido associadas a alta mortalidade e sequelas de longo prazo ao comprometimento da função renal (FOXMAN, 2003). Anualmente, nos EUA mais de 1 milhão de hospitalizações e US \$ 1,6 bilhão são utilizados para despesas médicas (ULETT *et al.*, 2013).

UPEC age como um patógeno intracelular oportunista, sendo capaz de formar comunidades intracelulares e protegendo-se da resposta imune do hospedeiro, sendo assim, capaz de causar diversos tipos de manifestações clínicas e estão presentes no intestino de cerca de 20% das pessoas saudáveis (AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012; DALE; WOODFORD, 2015). Este patógeno é capaz de escapar do sistema imune pela produção da proteína TraT, uma proteína de membrana externa associada com a resistência à atividade bactericida do soro (ULETT *et al.*, 2013).

Estima-se que até 90% dos episódios de ITU/ano são causados pela UPEC (BASU *et al.*, 2013). Nos pacientes hospitalizados de longa permanência, as UPECs podem desenvolver desde pneumonia, bacteremia, até prostatite e normalmente apresentam um perfil maior de resistência aos antimicrobianos que as

amostras isoladas na comunidade (BÉLANGER *et al.*, 2011). UPECs causam milhões de episódios de ITUs no mundo, sendo responsável por 90% de todas as infecções adquiridas na comunidade e, aproximadamente, 50% das infecções nosocomiais (CAO *et al.*, 2011). Outros estudos realizados em diversos países do mundo, inclusive no Brasil mostram uma variação de 64 a 90% nas taxas de prevalência de ITU por *E. coli* (SILVA, 2007). O segundo patógeno mais comumente relacionado a ITU é o *Staphylococcus saprophyticus*, e na sequência são relatadas outras espécies como *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012, WANG *et al.*, 2013).

As ITU podem ser classificadas em alta ou baixa. A ITU baixa, ou cistite aguda, refere-se à infecção da bexiga, por outro lado, a infecção alta, ou pielonefrite, refere-se à infecção dos rins. Esta patologia é mais comum em mulheres do que em homens por conta de características anatômicas do trato geniturinário feminino e da presença de substâncias antibacterianas no fluido prostático masculino (FIHN, 2003). Estas infecções se instalam por via ascendente, onde as bactérias provenientes do ambiente intestinal ascendem à uretra em direção à bexiga e aos rins (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Primeiramente acontece a adesão bacteriana às células uroepiteliais por conta das fímbrias P e do tipo 1. Depois de estabelecida a adesão, ocorre a apoptose e exfoliação das células epiteliais, seguido do influxo de leucócitos polimorfonucleares. Após o estabelecimento da infecção na bexiga, se não tratada, as bactérias podem ascender pelos ureteres e estabelecer infecção nos rins. Neste estágio o tratamento da doença é fundamental, pois a partir da infecção renal as bactérias podem alcançar o sistema venoso e causar a sepse (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Outra infecção causada por *E. coli* é a meningite neonatal, sendo o microrganismo mais comum entre os Gram negativos a causar esta infecção, e está entre as principais infecções causadoras de mortes (PEIGNE *et al.*, 2009; FURYK; SWANN; MOLYNEUX, 2011; LOQUE *et al.*, 2012). NMEC é considerada como a segunda causa de meningite neonatal nos países industrializados, perdendo apenas para o estreptococo do grupo B. A letalidade da doença varia entre 15 a 40%, além de causar sequelas neurológicas em 30 a 50% dos casos (PEIGNE *et al.*, 2009; LOQUE *et al.*, 2012).

NMEC apresenta vários fatores de virulência adquiridos, que atravessam a barreira hamatoencefálica, em sua maioria polissacarídeo capsular do tipo K1 e fimbrias S. Quanto à classificação filogenética, estes isolados pertencem ao grupo filogenético B2 e apresentam um número restrito de sorogrupos, sendo que 80% das cepas são do tipo capsular K1. Estas cepas utilizam fimbrias S para se ligar a superfície do endotélio do cérebro, além de utilizar outros receptores das células endoteliais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PEIGNE *et al.*, 2009; KATOULI, 2010; LOQUE *et al.*, 2012). A infecção pode ser adquirida durante o parto ou mesmo por microrganismos que colonizam o trato respiratório ou intestinal do recém-nascido. Um fator que contribui para gravidade da infecção é a imaturidade do sistema imune do neonato (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

Presente em animais, APEC também é um importante patógeno por causar prejuízos econômicos à indústria aviária, e associada a doenças como a onfalite, peritonite, sinovite e celulite, além de apresentarem variados fatores de virulência, que incluem fimbrias P, K1, aerobactina e cápsula (MELLATA *et al.*, 2003). Ewers *et al.* (2007) estudando 526 cepas de origem veterinária e médica, concluíram que as aves podem ser um veículo ou mesmo um reservatório para isolados de ExPEC no homem, permitindo assim, serem reservatórios de genes associados à virulência para UPEC e NMEC. A presença de um clone denominado ST-131, causando infecção urinária apresentando resistência às fluoroquinolonas, levanta a possibilidade de uma fonte externa, que provavelmente pode ser através de alimentos, especialmente frangos, visto que, essa classe de droga tem sido muito utilizada como ração para estas aves (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Embora a ocorrência de *E. coli* relacionada a sepse (SEPEC) tenha aumentado nos últimos anos, ainda são poucos os relatos detalhando os mecanismos de *E. coli* associado a sepse. Estudos tem demonstrado que a adesão e invasão de cepas humanas de SEPEC são raros. Em contraste com UPEC e NMEC, as cepas SEPEC não exibem um perfil de virulência molecular bem definido e seus mecanismos de patogenicidade não são claros (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012).

SEPEC surgiu como um grupo distinto de *E. coli* que exhibe uma combinação das características de virulência diferente dos outros grupos de *E. coli*. Estudos demonstram a alta prevalência de genes de adesina e a baixa prevalência de genes de invasinas, sugerindo que SEPEC provavelmente adere à superfície celular por mecanismos diferentes dos de outras cepas de *E. coli*. Além disso, é

provável que as cepas SEPEC possam expressar outros fatores de adesão que ainda não se sabe se estão envolvidos em sua patogenicidade, e estes também podem desempenhar papel na especificidade do tecido e na adesão da SEPEC às células epiteliais e endoteliais (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE EXPEC

Podem-se definir fatores de virulência como condições específicas que acabam contribuindo para a patogenicidade, e que são codificados por genes presentes no agente patogênico (MOKADY; GOPHNA; RON, 2005). Estes genes de virulência oportunizam a colonização de novos sítios, penetração e invasão de novos nichos em seus hospedeiros (SAVIOLLI, 2010).

Os fatores de virulência auxiliam o microrganismo a colonizar a superfície do hospedeiro, evitando e/ou prejudicando a ação dos mecanismos de defesa do mesmo, danificando e/ou invadindo suas células e tecidos, e fomentando assim uma resposta inflamatória nociva, responsável por doenças intestinais e extraintestinais como as do trato urinário, meningite e sepse (BIDET; BONARCORSI; BINGEN, 2012; BALDY-CHUDZIK; MAZUREK; BOK, 2015).

Sabe-se que estes fatores estão associados de forma geral à colonização e a capacidade de sobrevivência no ambiente. O que diferencia cada fator são as diferentes estratégias para provocar infecção, mediadas por fatores específicos de virulência, e estes são codificados por genes localizados em plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade ou em bacteriófagos (CROXEN; FINLAY, 2010). Entretanto, o fator determinante não é a presença ou ausência de um gene relacionado com a virulência, mas sim seu nível de expressão, que pode ser variável entre as cepas patogênicas e não patogênicas (MOKADY; GOPHNA; RON, 2005).

De forma geral, podemos destacar entre os fatores de virulência em ExPEC as adesinas, invasinas (invasão e evasão), sistemas de captação de ferro, toxinas e proteases, além de fatores de resistência sérica (SANTOS *et al.*, 2009; SCHOULER *et al.*, 2012; BALDY-CHUDZIK; MAZUREK; BOK, 2015). Estes e outros fatores estão representados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais fatores de virulência de ExPEC.

	Fatores de virulência	Genes codificantes
Adesinas	Sideróforo de adesão	<i>iha</i>
	Adesina da família Dr	<i>afaA/draBC</i>
	Pilus comum de <i>E. coli</i>	<i>ecpA</i>
	Fímbria F1C	<i>foc</i>
	Hemaglutinina resistente ao calor	<i>hra</i>
	Fímbria específica N- acetil D- glucosamina	<i>gaf</i>
	Hemaglutinina sensível ao calor	<i>tsh</i>
	Fímbria M	<i>bmaE</i>
	Fímbria P	<i>papACEFG</i>
	Fímbria S	<i>sfa/sfaS</i>
Fímbria tipo 1	<i>fimH</i>	
Aquisição de Ferro	Receptor de aerobactina	<i>lutA</i>
	Proteína periplasmática de ligação ao ferro	<i>sitA</i>
	Receptor salmoquelina	<i>ironN</i>
	Receptor sideróforo	<i>ireA</i>
	Receptor yersiniabactina	<i>fyuA</i>
Toxinas	α - hemolisina	<i>hylD</i>
	Toxina citoletal distensora	<i>cdtB</i>
	Fator citotóxico necrosante	<i>cnf1</i>
	Toxina de <i>E. coli</i> enteroagregativa	<i>astA</i>
	Hemolisina A	<i>hylA</i>
	Toxina autotransportadora	<i>sat</i>
	Toxina vacuolizante	<i>vat</i>
Invasinas e proteases	Proteínas de conjugação	<i>tratT</i>
	Resistência ao soro	<i>iss</i>
	Invasão do endotélio cerebral	<i>ibeA</i>
	Cápsula do grupo 2	<i>kpsMT II</i>
	Cápsula do grupo 3	<i>kspMT III</i>
	Variantes K1/K2/K5 do grupo de cápsula 2	genes k1/k2/k5

Fonte: Adaptado de Dale e Woodford (2015).

2.3.1 Adesinas

A adesão é considerada fundamental para que a bactéria se estabeleça no hospedeiro e cause uma infecção, desta forma, as adesinas são essenciais para a patogênese (BAHRANI-MOUGEOT *et al.*, 2001). Situadas nas extremidades das fímbrias, as adesinas são apêndices filamentosos presentes na superfície bacteriana e realizam a ligação aos receptores da célula do hospedeiro (BAHRANI-MOUGEOT *et al.*, 2001). Estas estruturas também influenciam nas vias de sinalização tanto no hospedeiro como nas células bacterianas, as quais podem determinar se as bactérias permanecem extracelulares ou tornam-se internalizadas (CHAHALES; THANASSI, 2015).

A UPEC pode expressar várias classes de adesinas que intermedeiam a adesão através da ligação específica a diferentes receptores, que lhe permite colonizar locais onde frequentemente não habitam (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Entre as várias adesinas conhecidas, podemos citar a fímbria tipo 1, fímbria tipo P, fímbria tipo S, adesinas Dr as quais auxiliam na colonização e desempenham importante papel no desenvolvimento de ITU em humanos (JOHNSON, 1991; OELSCHLAEGER; DROBRINDT; HACKER, 2002; STAMM, 2006; SZEMIAKO *et al.*, 2013).

De modo geral, as fímbrias ou pili são apêndices filamentosos, retilíneos, de 2-7 nanômetros de comprimento, presentes na superfície celular em número de 100 a 1000 por célula (KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010). São estruturas proteicas que reconhecem sítios específicos na célula hospedeira como em um esquema de chave-fechadura (KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010). A fímbria é codificada por um operon que possui seis genes (*ecpRABCDE*), onde o maior componente da fímbria é uma proteína com aproximadamente 18 kDa codificada pelo gene *ecpA* (POUTTU *et al.*, 2001).

As fímbrias tipo 1 são expressas pela maioria das *E. coli* (FRENCH, 2006), estando presentes de forma uniforme na superfície bacteriana de aproximadamente 90% das UPEC, sendo uma das estruturas superficiais mais abundantes (RIBIC *et al.*, 2017). Esta fímbria possui cerca de 7 nm de diâmetro e 0,2 a 2 µm de comprimento (KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010). Elas são codificadas por um grupo de genes *fim*, presentes no cromossomo da *E. coli* tanto patogênicas quanto não patogênicas, estes são formadas a partir de 4 tipos

diferentes de pilinas: a haste, que é composta por 1.000 cópias da pilina *fimA* (codifica o maior componente da fímbria), uma subunidade da proteína FimG e uma de FimF (proteínas auxiliares), e na extremidade uma única cópia da adesina *fimH* (MOL; OUDEGA, 1996; DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; ANTÃO; WIELER; EWERS, 2009).

A ligação da adesina *fimH* a receptores manosilados presentes no urotélio é essencial para a colonização da bexiga pela *E. coli* e o desenvolvimento da cistite (LANGERMANN *et al.*, 1997; THANKAVEL *et al.*, 1997; WRIGHT; SEED; HULTGRAN, 2007). Apesar do *fimH* ser expresso em vários patótipos de *E. coli*, foi comprovado que sua expressão é induzida logo após a entrada de bactérias na bexiga (STAMM, 2006). Este gene se liga ao receptor da uroplaquina 1a (UP1a), encontrada nas células da superfície da bexiga, e promovem a aderência bacteriana e consequente rearranjo do citoesqueleto de actina das células do hospedeiro, que acaba estimulando o englobamento das bactérias aderentes (STAMM, 2006).

Na sequência, ocorre um processo que envolve alterações fisiológicas e morfológicas nas células bacterianas acarretando a formação de um biofilme (WU; SUN; MEDINA, 1996; MARTINEZ *et al.*, 2000; WRIGHT; SEED; HULTGREN, 2007). Estes biofilmes contribuem para a formação de comunidades bacterianas intracelulares, as quais atuam como reservatórios do patógeno, e que na presença dos biofilmes permanecem protegidos contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e tratamento com antimicrobianos, servindo então como fonte para ITU subsequentes (JUSTICE *et al.*, 2006; CHAHALES; THANASSI, 2015). As fímbrias tipo 1 também são conhecidas por contribuir na formação de biofilmes extracelulares, ou seja, estas fímbrias possuem papel tanto intracelular quanto extracelular durante a patogênese de UPEC (CHAHALES; THANASSI, 2015).

A fímbria P é constituída por uma subunidade maior, a PapA, que constitui a estrutura da fímbria, e outras três subunidades menores (PapE, PapF e PapG), localizadas na extremidade da fímbria (JOHNSON, 1991; OELSCHLAEGER; DOBRINDT; HACKER, 2002). A ligação de PapE e PapF aos receptores Gal α (1-4)Gal nas células uroepiteliais impede a eliminação da bactéria da bexiga, rompendo a barreira mucosa e estimulando a resposta imune do hospedeiro (CHAHALES; THANASSI, 2015). Esta fímbria é codificada pelo operon *pap* (pili associado a pielonefrite) que está presente em um ou mais elementos genéticos móveis, conhecidos como ilhas de patogenicidade (CHAHALES; THANASSI, 2015).

A fímbria P reconhece glicopeptídeos contendo α -D-galactose (1-4) β -D-galactose, e está associada a infecções do trato urinário, já que estes glicolipídios estão presentes na superfície de células uroepiteliais, e ao se ligarem aos mesmos, impedem a eliminação da bactéria da bexiga, o que provoca o rompimento da barreira mucosa e desencadeia a resposta imune do hospedeiro, acarretando em quadros clínicos inflamatórios (JOHNSON, 1991, DOZOIS *et al.*, 1992, BERGSTEN *et al.*, 2004). A correlação entre a presença da fímbria P e a severidade da infecção é justificada pela baixa prevalência (10 a 20%) desta adesina em estirpes de *E. coli* em indivíduos assintomáticos e pela alta prevalência (50 a 60%) em estirpes causadoras de cistite, e prevalência ainda superior (70 a 100%) em estirpes causadoras de pielonefrite (SVENSON *et al.*, 1983; STAPLETON *et al.*, 1995).

Esta fímbria aumenta a virulência de UPEC em diferentes estágios durante a patogênese da infecção do trato urinário. A presença do *pap* faz com que essas bactérias permaneçam mais tempo na microbiota intestinal e se disseminem de forma mais eficiente para o trato urinário quando comparado com as *pap* (-) (WARREN; MOBLEY; TRIFILLIS, 1988). Uma vez no trato urinário, as cepas com a fímbria P estabelecem bacteriúria e podem atravessar a barreira epitelial para a corrente sanguínea (WARREN; MOBLEY; TRIFILLIS, 1988), potencializando a resposta do hospedeiro à infecção, provocando um aumento de neutrófilos e elevação dos níveis de IL-6 e IL-8 na urina (WULLT *et al.*, 2001).

Já a fímbria S é constituída por quatro proteínas, sendo uma principal Sfa-A e três proteínas menores (Sfa-G, Sfa-H e Sfa-S) sendo codificada pelo gene *sfa* (OLIVEIRA; PALUDO; AREND, 2011). A subunidade Sfa-G, que se encontra na extremidade da fímbria, é responsável por intervir na atividade de ligação específica ao receptor (OLIVEIRA; PALUDO; AREND, 2011, RIBIC *et al.*, 2017). A fímbria S utiliza como receptor o ácido siálico, um elemento presente em diversos locais como: eritrócitos, células epiteliais, ductos coletores, glomérulos, entre outros. Devido a isto, o gene *sfa* é detectado com alta frequência em isolados de meningite e sepse. Também é possível encontrar a fímbria S expressa em cepas de humanos com infecção urinária (OLIVEIRA; PALUDO; AREND, 2011, RIBIC *et al.*, 2017).

São consideradas importantes também as adesinas da família Dr, já que sua presença tem sido relacionada ao aumento do risco de um segundo

episódio da infecção urinária (FOXMAN; KI; BROWN, 2007). Guignot *et al.* (2001) mostraram a importância destas adesinas nas ITU crônicas devido a habilidade apresentada pelas *E. coli* Dr+ em invadir e se multiplicar no interior das células epiteliais *in vitro*.

A família Dr (gene *afaA/draBC*) inclui adesinas fimbriais como a hemaglutinina Dr (adesina *draE*) e F1845, além das adesinas afimbriais, diretamente associadas à superfície da célula bacteriana, tais como AFA-I, AFA-II, AFA-III e AFA-IV (NOWICKI; SELVARANGAN; NOWICKI, 2001; VAN LOY; OKURENKO; MOSELEY, 2002; PETTIGREW *et al.*, 2004), que estimulam a ligação de bactérias em diversos tipos de células hospedeiras (COTA *et al.*, 2006). Estas adesinas são epidemiologicamente associadas com cepas patogênicas causadoras de ITU crônicas, cistite em crianças e pielonefrite em gestantes (NOWICKI; SELVARANGAN; NOWICKI, 2001).

Outro exemplo de adesina é a hemaglutinina temperatura-sensível (TSH). Provence e Curtiss (1992) a isolaram e caracterizaram pela primeira vez em amostras de APEC (*Escherichia coli* potencialmente patogênicas para aves) que causavam aerossaculite e colicepticemia. Trata-se de uma proteína com aproximadamente 140 kDa, sendo expressa em temperaturas entre 26 a 30°C e reprimida à 42°C. Esta é codificada pelo gene *tsh*, que está inserido em um plasmídeo associado à produção de colicina V, além de carregar genes do operon aerobactina (DOZOIS *et al.*, 2000). Heimer e colaboradores (2004), analisando amostras humanas encontraram o gene *tsh* em 63% de UPEC e em 33% de *E. coli* isolada de fezes.

2.3.2 Sistemas de aquisição de ferro

O ferro é um elemento fundamental e de extrema importância para a sobrevivência das bactérias pelo fato de encontrar-se em pequena disponibilidade para as mesmas (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). Também é importante ressaltar que no hospedeiro, o ferro disponível para as bactérias está em pequenas concentrações, uma vez que 99,9% desse íon encontram-se complexado com o grupo heme ou proteínas ligantes de ferro, principalmente na urina, onde o teor de ferro é muito limitado (~0,1 µmol por litro) (WEINBERG, 2009).

Outra utilização do ferro é durante a patogênese, pois este atua como cofator de grupos de enzimas essenciais envolvidas em muitas funções celulares e vias metabólicas bacterianas como a replicação, cadeia de transporte de elétrons, transporte de oxigênio, síntese de DNA e metabolismo de peróxidos (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). No trato urinário, a aquisição do ferro pela UPEC é necessária para a colonização, sendo um dos nutrientes limitantes para que a bactéria sobreviva dentro do vacúolo das células epiteliais da bexiga. No entanto, a concentração de ferro livre na bexiga é baixa em relação a necessidade bacteriana, demonstrando a importância de se desenvolver formas para adquirir este elemento (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018).

Sendo assim, as ExPEC desenvolveram estratégias para aquisição e armazenamento de ferro do hospedeiro, como a expressão de sideróforos, estruturas de baixo peso molecular que quelam o ferro com alta afinidade (DURANT *et al.*, 2007; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

Os sideróforos são pequenas moléculas produzidas e secretadas por bactérias, que possuem alta afinidade com íons férricos e tem a função de remover o ferro existente em proteínas carreadoras (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). Após a ligação ao Fe^{3+} , o sideróforo é capturado e internalizado pelas bactérias usando receptores específicos de membrana externa. Cepas de *E. coli* podem sintetizar quatro tipos de sideróforos, sendo estes a enterobactina, salmoquelina, yersiniabactina e aerobactina (KHASHEII; ANVARI; JAMALLI, 2016). A enterobactina é produzida e utilizada por quase todas as cepas de *E. coli*, já os genes que codificam os sistemas aerobactina, salmoquelina e yersiniabactina são encontrados mais frequentemente em cepas patogênicas e que possuem uma alta prevalência entre os grupos de ExPEC (GARCIA; BRUMBAUGH; MOBLEY, 2011).

A salmoquelina foi encontrada primeiramente em espécies de *Salmonella* e algumas cepas de *Klebsiella*, sendo o sideróforo glicosilado mais recentemente a ser identificado (MULLER; VALDEBENITO; HANTKE, 2009; ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). A salmoquelina é codificada pelo cluster do gene *iroA*, que inclui outros cinco genes (*iroB*, *iroC*, *iroD*, *iroE* e *iroN*). A proteína IroN demonstrou ser um receptor de membrana externa para a captação de salmoquelinas de Fe^{3+} e transporta o complexo sideróforo- Fe^{3+} (ROBINSON;

HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). Esta proteína é encontrada principalmente em *Salmonella enterica* e algumas cepas de ExPEC (CAZA *et al.*, 2008).

Já yersiniabactina é um sistema de captação de ferro utilizado originalmente por cepas patogênicas de *Yersinia* spp. Contudo, estudos identificaram que algumas cepas de UPEC também produzem e utilizam esse sideróforo (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015). A biossíntese de yersiniabactina é codificada pela chamada ilha de alta patogenicidade (HPI). Um dos genes mais importantes que residem no HPI é *fyuA*, que codifica a proteína de membrana externa FyuA, responsável pela absorção de sideróforo de Fe-Ybt (ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). O gene *fyuA* tem sido associado à virulência em muitos membros da família *Enterobacteriaceae* e considerado fundamental para a formação de biofilmes em ambientes pobres em ferro, como por exemplo, a urina humana (SPURBECK *et al.*, 2012).

A aerobactina é um sideróforo originalmente isolado de *Aerobacter aerogenes*, sendo a forma de captação e transporte de ferro mais consumida pela bactéria. O operon contendo genes que a sintetizam (*iucABCD*) e os receptores da membrana externa (*iutA*) estão presentes no cromossomo ou plasmídeos associados à virulência de UPEC (TOKANO *et al.*, 2008; ROBINSON; HEFFERNAN; HENDERSON, 2018). Este sideróforo é excretado ao meio e se liga ao íon férrico formando um complexo estável, por meio do qual o ferro é transportado para o citoplasma (BRAUN, 2003). A frequência de genes codificantes de aerobactina se mostra maior em isolados da bexiga, rins e sangue quando comparados a isolados fecais de pacientes com ITU, além de também estarem mais associados a infecções recorrentes (GARCIA; BRUMBAUGH; MOBLEY, 2011)

Além dos variados tipos de sideróforos presentes em UPEC, a proteína ChuA também representa um importante fator de virulência relacionado a captação de ferro nessas bactérias (GAO *et al.*, 2012). Essa proteína é um receptor específico de superfície bacteriana do grupo heme, o qual contém a maior parte do ferro do organismo hospedeiro (GAO *et al.*, 2012). Após ligar-se a este grupo ela o transfere para dentro do periplasma onde será internalizado para o citoplasma através de proteínas específicas de transporte (GAO *et al.*, 2012). Hagan e Mobley (2007) demonstraram em um estudo, que os genes que codificam a proteína ChuA são expressos durante o crescimento sob condições de ferro limitadas, incluindo na urina humana e durante ITU experimental. Além disso, também relataram que a

presença do gene *chuA* é mais comum em cepas de UPEC do que em cepas comensais. Além da importância na aquisição do ferro, o gene *chuA* também parece ser importante na formação pelas cepas das IBCs (comunidades bacterianas intracelulares precoce) (REIGSTAD; HULTGREN; GORDON, 2007).

Por fim, o gene *sitA* é responsável por codificar um transportador periplasmático de ferro e também considerado um carregador de manganês. Citado inicialmente em sistemas para a virulência de APEC e posteriormente em estirpes de *E. coli*, este, em combinação com outros sistemas de transporte de íons, pode contribuir na desintoxicação de radicais livres e resistência ao estresse oxidativo (SABRI; LÉVEILLÉ; DOZOIS, 2006).

2.3.3 Toxinas e proteases

As cepas uropatogênicas necessitam produzir toxinas para danificar o tecido do hospedeiro a fim de liberar nutrientes para que possam sobreviver e crescer, além de estabelecer um nicho para invasão e disseminação bacteriana (FLORES-MEIRELES *et al.*, 2015). As toxinas secretadas por UPEC incluem α -hemolisina, fator necrotizante citotóxico do tipo 1 (CNF-1) e toxina de secreção auto transportadora (Sat), as quais são capazes de alterar as cascatas de sinalização da célula hospedeira, articular a resposta inflamatória e estimular a destruição da célula hospedeira, liberando os nutrientes necessários e permitindo que UPEC tenha acesso ao trato urinário (DHAKAL; KULESUS; MULVEY, 2008).

Apesar da função específica das toxinas α -hemolisina e CNF1 na patogênese de ITU mediada por UPEC ser pouco compreendida, sabem-se que estas duas toxinas são coexpressas por várias estirpes que são capazes de causar citotoxicidade direta aos tecidos do hospedeiro (DAVIS *et al.*, 2006; YAMAMOTO, 2007).

A hemolisina é membro da família de toxinas RTX (*repeats-in-toxin*) sendo inicialmente isolada em UPEC J96 (WELCH, 1991) e produzida através da ação direta de quatro genes codificados em um operon (*hlyCABD*) (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). O produto proteico secretado é a α -hemolisina (HlyA), codificada pelo gene *hlyA* e pode localizar-se em uma ilha de patogenicidade ou em um plasmídeo (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008; WELCH, 2016). Esta toxina, após ser secretada pela bactéria, associa-se a um receptor da célula alvo, como por

exemplo, eritrócitos, granulócitos ou monócitos, e se introduz na membrana ocasionando a formação de canais, o que desestabiliza os gradientes de concentração da membrana e como consequência gera seu rompimento, extravasando o conteúdo citoplasmático, facilitando assim a aquisição de ferro e nutrientes pelas bactérias (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008; WELCH, 2016).

A toxina HlyA também possui função de esfoliação, tanto para expor camadas mais profundas do uroepitélio para colonização quanto para disseminação bacteriana para outros hospedeiros após a expulsão celular na urina. O *hlyA* é altamente expresso em IBCs, sugerindo ser importante durante este estágio da infecção (FLORES-MEIRELES *et al.*, 2015).

Além disso, danos renais provocados pela ação da α -hemolisina podem induzir oscilações de íons Ca^{2+} nas células epiteliais tubulares e interromper o fluxo normal de urina, o que potencializa a ascensão e colonização de ureteres e parênquima renal (TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017). As hemolisinas determinam a patogenicidade de diversos agentes bacterianos, uma vez que estas agem degradando os tecidos do hospedeiro, possibilitando a invasão e disseminação, além da evasão à resposta imune (CHIH-WEI *et al.*, 2011). Outro gene importante é o *hlyF*, frequentemente encontrado em amostras de APEC por ser uma possível hemolisina aviária, também encontrada em amostras de NMEC (PEIGNE *et al.*, 2009).

Isolados de UPEC também secretam o fator necrosante citotóxico 1 (CNF1) e o fator necrosante citotóxico 2 (CNF2), toxinas que atuam na barreira epitelial e nas funções das células imunológicas (PITEAU *et al.*, 2014). O CNF-1 é codificado pelo gene *cnf1* localizado em uma ilha de patogenicidade, próximo ao operon da α -hemolisina (BOQUET, 2001) enquanto o CNF2 é codificado por um gene plasmidial (FALBO *et al.*, 1993). CNF1 e CNF2 são toxinas capazes de causar necrose e letalidade *in vivo*, além de serem capazes de induzir alterações no citoesqueleto em cultura de células (BLANCO *et al.*, 1996).

O CNF-1 entra na célula hospedeira através de vesículas endocíticas e ativa GTPases da família Rho, as quais estão envolvidas na regulação de uma variedade de processos celulares (WELCH, 2016). Um desses processos é o rearranjo do citoesqueleto de actina e *ruffling* da membrana, o que leva ao aumento da internalização de bactérias pelas células hospedeiras (PITEAU *et al.*, 2014). Além disso, a ativação de GTPases induz vias antiapoptóticas e pró-

sobrevivência da célula hospedeira impedindo a apoptose do uroepitélio colonizado, facilitando a sobrevivência da UPEC e protegendo o nicho (FLORES-MEIRELES *et al.*, 2015). Os fatores citotóxicos necrosante (CNF1 e CNF2) são associados principalmente com cepas patogênicas de ExPEC que causam infecção do trato urinário e meningite (PITEAU *et al.*, 2014; FLORES-MEIRELES *et al.*, 2015).

A toxina auto transportadora vacuolizante (Vat) é uma citotoxina conhecida por contribuir na sobrevivência bacteriana durante a infecção sistêmica (NICHOLS *et al.*, 2016). O gene *vat* foi originalmente identificado em 2003, dentro de uma Ilha de Patogenicidade (Vat-PAI) da cepa septicêmica APEC EC222 (NICHOLS *et al.*, 2016). Parreira e Gyles (2003) em análises com *vat* verificaram que ela possui atividade citotóxica e vacuolizante nas células alvo. O gene *vat* é encontrado com maior frequência em cepas associadas à sepse, e por isso, sugere-se que ela pode ser necessária para a *E. coli* entrar ou sobreviver dentro da corrente sanguínea (NICHOLS *et al.*, 2016).

As proteases são enzimas que catalisam a quebra de ligações peptídicas em proteínas, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres (THOMASSIN *et al.*, 2012). Entre as proteases incluídas nos mecanismos de virulência, podemos citar a protease *ompT* (THOMASSIN *et al.*, 2012). Esta protease é codificada pelo gene *ompT*, pertencente à família das *omptinas*, que está presente em membros da família *Enterobacteriaceae*, sendo caracterizado como um ativador do plasminogênio, com a capacidade de hidrolisar a protamina e bloquear a sua entrada (VANDEPUTTE-RUTTEN *et al.*, 2001; THOMASSIN *et al.*, 2012). As *omptinas* estão relacionadas com a virulência de várias bactérias Gram-negativas patogênicas, entre elas a *E. coli* (HUANG *et al.*, 2001). O gene *ompT* possui um papel importante nas infecções extraintestinais, sendo que em isolados clínicos de *E. coli* tem sido associado com doenças do trato urinário (HUANG *et al.*, 2001).

2.3.4 Resistência sérica

Outro elemento importante para a sobrevivência de UPEC é a resistência sérica, uma vez que no soro humano normal, as bactérias são destruídas pela atividade lítica do sistema complemento (MIAJLOVIC; SMITH, 2014). Trata-se de uma característica importante para a patogênese uma vez que auxilia a bactéria a permanecer nos fluidos e órgãos internos do hospedeiro (MELLATA *et al.*, 2003).

Essa resistência ao soro implica em modificações na superfície externa da bactéria que impossibilitam o reconhecimento por anticorpos produzidos pelo hospedeiro. Essas alterações podem ocorrer por meio de cápsulas, lipopolissacarídeos ou proteínas de origem plasmidial (JOHNSON; RUSSO, 2005).

Este sistema é ativado para a destruição bacteriana quando ocorre a formação de um complexo antígeno-anticorpo específico (via clássica) ou diretamente pela estrutura polissacarídica do envelope celular, na ausência de anticorpos específicos (via alternativa) (JOHNSON, 1991). Em ambas as vias, ocorre a formação de um complexo de ataque a membrana (MAC), que forma poros permitindo o acesso de lisozimas e digestão da parede celular levando a lise (JOHNSON, 1991). Diante disso, a estratégia de cepas uropatogênicas foi de alterar a superfície celular através da produção de cápsulas polissacarídicas extracelulares ou proteínas codificadas por plasmídeos, e desta forma, inibem a ativação/funcionamento da reação em cascata do sistema complemento (MIAJLOVIC; SMITH, 2014).

Segundo Johnson (1991), isolados resistentes ao soro são geralmente mais nefropatogênicos em comparação aos isolados sensíveis, e os isolados de pacientes com pielonefrite e cistite são mais resistentes ao soro do que os de pacientes com bacteriúria assintomática.

Relacionado a resistência aos efeitos líticos do soro está presente o gene *iss*, encontrado em plasmídeos e codifica a proteína de sobrevivência sérica *Iss* (*increased serum survival*) (BINNS; MAYDEN; LEVINE, 1982). Este gene bloqueia o complexo terminal do sistema do complemento que opera na membrana celular causando a lise da célula, conseqüentemente, torna a bactéria resistente ao complemento (BINNS; MAYDEN; LEVINE, 1982). O gene *iss* pode ser considerado um determinante genético capaz de interferir na resistência da bactéria aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro. Já foi verificado aumento em 20 vezes da capacidade de resistência das células bacterianas aos efeitos do soro pela expressão deste gene (GUASTALI, 2010; DE PAULA, 2012).

Dentre os fatores que parecem ser determinantes da resistência sérica em isolados de *E. coli* está a proteína TraT. Essa proteína é constituída por uma lipoproteína da membrana externa codificada pelo gene *traT* que confere resistência sérica a cepas patogênicas interferindo na morte mediada pelo complemento (MIAJLOVIC; SMITH, 2014). O gene *traT* aumenta a resistência ao

soro em isolados não encapsulados quando presente em baixo número de cópias, enquanto em isolados encapsulados, números mais altos de cópias do *traT* devem estar presentes para afetar a resistência ao soro (JOHNSON, 1991; MELLATA *et al.*, 2003). Estudos relacionam também o gene *traT* com o impedimento da deposição de C3 na membrana bacteriana, efetuando uma função de inibição da fagocitose (DZIVA; STEVENS, 2008).

Os ácidos polissíálicos são importantes fatores de virulência durante a patogênese de *E. coli*, produzindo dois tipos de ácidos: NeuNAc (α 2-8) de K1 (MCGUIRE; BINKLEY, 1964) e a estrutura alternada, NeuNAc (α 2-8) e NeuNAc (α 2-9) de K92 (EGAN *et al.*, 1977). Ambas as cápsulas K1 e K92 pertencem ao chamado cápsulas do grupo II. A *E. coli* K1 é responsável por 80% da meningite neonatal além de ser um patógeno comum em infecções do trato urinário (ANDREISHCHEVA; VANN, 2006).

Outra proteína relatada é a IbeA codificada pelo gene *ibeA*. A esta proteína é atribuída a habilidade de cepas de *E. coli* em invadir células endoteliais da microvasculatura cerebral (BMEC), sendo responsável por causar meningite neonatal em humanos e relacionado também a cepas de APEC (GERMON *et al.*, 2005; SAVIOLLI, 2010). Esta afinidade das *E. coli* que possuem o gene *ibeA* pelo sistema nervoso central pode ser devido a presença de receptores de *ibeA*, já identificados tanto em humanos quanto em animais (GERMON *et al.*, 2005; SAVIOLLI, 2010).

Diante dos dados apresentados, embora ExPEC seja comumente encontrada como comensal em seres humanos saudáveis, a presença desse grupo de *E. coli* em água pode ser um potencial problema de saúde para a população. Por conseguinte, os dados indicam claramente uma necessidade de se investigar ainda mais a ocorrência de *E. coli* patogênica, especialmente ExPEC, em águas de consumo humano.

3 REFERÊNCIAS

- Normas de acordo com NBR 6023/2018 de 14 de novembro de 2018.

AGARWAL, J.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 30, p. 141-149, 2012.

ANDREISHCHEVA, E.N.; VAN, W.F. *Escherichia coli* BL21(DE3) chromosome contains a group II capsular gene cluster. **Gene**, v. 15, n. 384, p. 113-119, 2006.

ANTÃO, E.M.; WIELER, L.H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2009.

BAHRANI- MOUGEOT, F. K.; PANCHOLI, S.; DAOUST, M.; DONNENBERG, M.S. Identification of putative urovirulence genes by subtractive cloning. **Journal of Infection Diseases**, v. 183, p. S21-S23, 2001.

BALDY-CHUDZIK, K.; MAZUREK, J.; BOK, E. Well-known and new variants of pathogenic *Escherichia coli* as a consequence of the plastic genome. **Postepy Hig Med Dosw**, v.69, p. 345-361, 2015.

BASU, S.; MUKHERJEE, S.K.; HAZRA, A.; MUKHERJEE, M. Caracterização molecular de *Escherichia coli* uropatogênicas: resistência ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina, fatores virulentos e antecedentes filogenéticos. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.7, p. 2727-2731, 2013.

BÉLANGER, L.; GARENAUX, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C. M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 1-10, 2011.

BERGSTEN, G.; SAMUELSSON, B.; WULLT, I.; LEIJONHUFVUD, H.; FISCHER, H.; SVANBORG, C. PapG-dependent adherence breaks mucosal inertia and triggers the innate host response. **Journal of Infection Diseases**, v. 189, p. 1734-1742, 2004.

BERMAN, H.; BARBERINO, M.G.; MOREIRA, E.D.; RILEY, L.; REIS, J.N. Distribution of strain type and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* causing meningitis in a large urban setting in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p.1418-1422, 2014. doi: 10.1128/JCM.03104-13.

BIDET, P.; BONARCORSI, S.; BINGEN, E. Virulence factors and pathophysiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Archives de Pediatrie: Organe Officiel de la Societe Francaise de Pediatrie**, v. 19, p. 80-92, 2012.

BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and *iss* of ColV, I-K94. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

BIRAWIDA, A.B.; SELOMO, M.; MALLONGI, A. Potential hazards from hygiene, sanitation and bacterium of refill drinking water at Barrang Lompo island (water and

food safety perspective). **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v. 157, 2018.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; ALONSO, M.P.; BALSALOBRE, C.; MOURINO, M.; MADRID, C.; JUÁREZ, A. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, n. 1, p. 95-101, 1996.

BOQUET, P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1) from *Escherichia coli*. **Toxicon**, v.39, p. 1673-1680, 2001.

BRAUN, V. Iron uptake by *Escherichia coli*. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 1409-1421, 2003.

BRUMBAUGH, A.R.; MOBLEY, H.L. Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, p. 663-676, 2012.

CABRAL, J.P.S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **International Journal Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 3657-3703, 2010.

CAO, X.; CAVACO, L. M.; LV, Y.; LI, Y.; ZHENG, B.; WANG, P.; HASMAN, H.; LIU, Y.; AARESTRUP, F. M. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections in 20 Chinese hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2496-2501, 2011.

CARRILLO, J.; DURÁN, C. Biosensors. Fast Identification of Bacteria for Quality Control of Drinking Water through a Static Headspace Sampler Coupled to a Sensory Perception System. **Biosensors**, v. 9, n. 1, p. 23, 2019. doi:10.3390/bios9010023.

CAZA, M.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DOZOIS, C.M. Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 8, p. 3539-3549, 2008.

CHAHALES, P.; THANASSI, D. G. Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 5, p.1-39, 2015.

CHIH-WEI, L.; YIU-KAY, L.; YU-TUENG, L.; YU-TSUENG, L.; RICHARD, L. G.; CHUN-MING, H. *Staphylococcus aureus* Hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting β -hemolysin and camp factor. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n.2, p. 401-409, 2011.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.

Companhia de Saneamento do Paraná-Sanepar. Relatório Mensal de Análise de Água.
Londrina: 2019.

- <http://www.sanepar.com.br/sanepar/usav/resultados.nsf/Analises?OpenAgent&Cod=153>. Acesso em: 03.09.19.
- CONCEIÇÃO, R.A.; LUDOVICO, M.S.; ANDRADE, C.G.T.J.; YANO, T. **Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 45, n. 5, p. 417-424, 2012.
- COSTA, P. M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A. J. F. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.10, p. 278-294, 2013.
- COTA, E.; JONES, C.; SIMPSON, P.; ALTROFF, H.; ANDERSON, K. L.; DU MERLE, L. The solution structure of the invasive tip complex from Afa/Dr fibrils. *Molecular Microbiology*, v. 62, p. 356-366, 2006.
- CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, p. 26-38, 2010.
- CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 26, p. 822-880, 2013.
- CUNHA, M.P.V.; SAIDENBERG, A.B.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; VIEIRA, M.A.M.; GOMES, T.A.T.; KNÖBL, T. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. *PLoS ONE*, v. 12, n. 6, e0178970, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178970>.
- DALE, A.P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, v.71, p.615-626, 2015.
- DAVIS, J. M.; CARVALHO, H. M.; RASMUSSEN, S. B.; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infection and Immunity*, v. 74, p. 4401-4408, 2006.
- DE PAULA, C.J.S. **Fatores de virulência, resistência antimicrobiana em isolados de *Escherichia coli* provenientes do trato genito-urinário de humano e das fezes de seus animais de companhia.** 2012. 49f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.
- DHAKAL, B. D.; KULESUS, R. R.; MULVEY M. A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 38, n.2, p.2-11, 2008.
- DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, v. 30, n. 2-3, p. 299-316, 1999.
- DIALLO, A.A.; BRUGÈRE, H.; KÉROURÉDAN, M.; DUPOUY, V.; TOUTAIN, P.L.; BOUSQUET-MÉLOU, A.; OSWALD, E.; BIBBAL, D. Persistence and prevalence of

pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase- producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater. **Water Research**, v. 47, p. 4719-4729, 2013.

DEZFULIAN, H.; BATISSON, I.; FAIRBROTHER, J. M.; LAU, P. C.; NASSAR, A.; SZATMARI, G.; HAREL, J. Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1375-1385, 2003.

DHAKAL, B. D.; KULESUS, R. R.; MULVEY M. A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 38, n.2, p.2-11, 2008.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, n. 2-3, p. 299-316, 1999.

DIALLO, A.A.; BRUGÈRE, H.; KÉROURÉDAN, M.; DUPOUY, V.; TOUTAIN, P.L.; BOUSQUET-MÉLOU, A.; OSWALD, E.; BIBBAL, D. Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase- producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater. **Water Research**, v. 47, p. 4719-4729, 2013.

DOZOIS, C.M.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTHER, J.M.; DESAUTELS, C.; CURTISS, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145-54, 2000.

DOZOIS, C. M.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J.; BOSSÉ, M. *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2648-2656, 1992.

DURANT, L.; METAIS, A.; SOULAMA-MOUZE, C.; GENEVARD, J.; NASSIF, X.; ESCAICH, S. Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 1916-1925, 2007.

DZIVA, F.; STEVENS, M.P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 355-366, 2008.

EBOMAH, K.E.; ADEFISOYE, M.A.; OKOH, A.I. Pathogenic *Escherichia coli* Strains Recovered from Selected Aquatic Resources in the Eastern Cape, South Africa, and Its Significance to Public Health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 7, p. 1506, 2018. doi: 10.3390/ijerph15071506.

EGAN, W.; LIU, T.Y.; DOROW, D.; COHEN, J.S.; ROBBINS, J.D.; GOTSCHLICH, E.C.; AND ROBBINS, J.B. Structure studies on the sialic acid polysaccharide antigen of *Escherichia coli* strain Bos-12. **Biochemistry**, v.16, p. 3687-3692, 1977.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTÁO, E. M.; LATURNUS, C.; DIEHI, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BOHNKE, U.; STEINRUCK,

H.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

FALBO, V.; PACE, T.; PICCI, L.; PIZZI, E.; CAPRIOLI, A. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 11, p. 4909-4914, 1993.

FIHN, S.D. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 259-266, 2003.

FLORES-MEIRELES, A. L.; WALKER, J. N.; CAPARON, M.; HULTGREN, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015.

FOXMAN, B. Epidemiologia das infecções do trato urinário: incidência, morbidade e custos econômicos. **Disease-A-Month**, v. 49, p. 53-70, 2003.

FOXMAN, B.; KI, M.; BROWN, P. Antibiotic resistance and pyelonephritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 281-283, 2007.

FREITAS, B.V.L. GERMINO, R.V.; TRINO, L.M.; DIÓRIO, S.M.; FUSARO, A.E. Prevalência e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de uropatógenos em pacientes atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 4, p. 375-380, 2016.

FRENCH, L. Urinary tract infection in woman. **Women's Health**, v.6, p. 24-29, 2006.

FRIGON, D.; BISWAL, B.K.; MAZZA, A.; MASSON, L.; GEHR, R. Biological and physicochemical wastewater treatment processes reduce the prevalence of virulent *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 835-844, 2013. doi: 10.1128/AEM.02789-12.

FURYK, J. S.; SWANN, O.; MOLYNEUX, E. Systematic review: neonatal meningitis in the developing world. **Tropical Medicine & International Health**, v. 16, n. 6, p. 672-679, 2011.

GAO, Q.; WANG, X.; XU, H.; XU, Y.; LING, J.; ZHANG, D.; GAO, S.; LIU, X. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. **BMC Microbiology**, v. 12, n.143, p. 1-12, 2012.

GARCIA, E. C.; BRUMBAUGH, A. R.; MOBLEY, H. L. T. Redundancy and Specificity of *Escherichia coli* Iron Acquisition Systems during Urinary Tract Infection. **Infection and Immunity**, v. 9, n. 3, p. 1225-1235, 2011.

GERMON, P.; CHEN, Y.H.; HE, L.; BLANCO, J.E.; BRÉE, A.; SCHOULER, C.; HUANG, S.H.; MOULIN-SCHOULEUR, M. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1179-1186, 2005.

GIBREEL, T. M.; DODGSON, A. R.; CHEESBROUGH, J.; FOX, A. J.; BOLTON, F. J.; UPTON, M. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of

uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 346-356, 2011.

GUASTALI, E. A L. **Estudo dos fatores de virulência, sorogrupos, patogenicidade e susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de pintainhas de reposição de postura**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

GUIGNOT, J.; BERNET-CAMARD, M. F.; POUS, C.; PLANCON, L.; LE BOUGUENEC, C.; SERVIN, A. L. Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH1128 into human epithelial cells: evidence for Alpha 5beta1 integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1856-1868, 2001.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. ***Escherichia coli***. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 231-265.

HAGAN, E.C.; MOBLEY, H.L.T. Uropathogenic *Escherichia coli* Outer Membrane Antigens Expressed during Urinary Tract Infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3941-3949, 2007.

HAMELIN, K.; BRUANT, G.; EL-SHAARAWI, A.; HILL, S.; EDGE, T.A.; BEKAL, S.; FAIRBROTHER, J.M.; HAREL, J.; MAYNARD, C.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from Great Lakes recreational waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 4200-4206, 2006.

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

HUANG, S. H.; WAN, Z. S.; CHEN, H. M.; JONG, A. Y. ***OmpT* contributing to *Escherichia coli* invasion of human endothelial cells**. In: Program and abstracts of the 101st general meeting of the American Society for Microbiology (Orlando, FL). Washington, DC: American Society for Microbiology. 2001. p. 54.

IAP (INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ). Monitoramento da qualidade da água do rio Tibagi e Barra Grande, na área de influência do futuro reservatório de Mauá e município de Londrina – Pr, no período de abril de 2010 a dezembro de 2011. http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Monitoramento/relatorio_2011_maua.pdf. Acesso em: 24.07.19.

ISHII, S.; SADOWSKY, M.J. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. **Microbes Environment**. v. 23, n. 2, 101–108, 2008.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 80-128, 1991.

JOHNSON, J. R.; MANGES, A. R.; O'BRYAN, T. T.; RILEY, L. W. A disseminated multidrug-resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis. **Lancet**, v. 359, n. 9325, p. 2249-2251, 2002.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". **Journal Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, n. 3, p. 155-162, 2002.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 383-404, 2005.

JOHNSON, J.R. Molecular epidemiology and population genetics of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. In: WALK, S.T; FENG, P.C.H. **Population Genetics of Bacteria: A Tribute to S Whittam**. Washington: ASM Press; 2011.

JUSTICE, S.; HUNSTAD, D.; SEED, P.; HULTGREN, S. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 3, p. 19884-19889, 2006.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KATOULI, M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 59-72, 2010.

KISTEMANN, T.; CLASSEN, T.; KOCH, C.; DANGENDORF, F.; FISCHEDER, R.; GEBEL, J.; VACATA, V.; EXNER, M. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2188–2197, 2002.

KHASHEII, B.; ANVARI, S.; JAMALLI, A. Frequency evaluation of genes encoding siderophores and the effects of different concentrations of Fe ions on growth rate of uropathogenic *Escherichia coli*. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 359-365, 2016.

KLEMM, P.; HANCOCK, V.; SCHEMBRI, M.A. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 5, p. 628-640, 2010.

KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 904-911, 2013.

KUMAR, S.; KUMAR, M.; RAJ, A.; PRAKASH, J. Evaluation of Genetic Analysis of *Escherichia coli* Isolated from Two Different Environmental Sources: Sewage Water Verses Soiled Bedding Materials of Laboratory Rodents. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60: e17160254, 2017.

KUMARASAMY, K.K.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R.; BAGARIA, J.; BUTT, F.; BALAKRISHNAN, R.; CHAUDHARY, U.; DOUMITH, M.; GISKE, C.G.; IRFAN, S.;

KRISHNAN, P.; KUMAR, A.V.; MAHARJAN, S.; MUSHTAQ, S.; NOORIE, T.; PATERSON, D.L.; PEARSON, A.; PERRY, C.; PIKE, R.; RAO, B.; RAY, U.; SARMA, J.B.; SHARMA, M.; SHERIDAN, E.; THIRUNARAYAN, M.A.; TURTON, J.; UPADHYAY, S.; WARNER, M.; WELFARE, W.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 597-602, 2010.

LANGERMANN, S.; PALASZYNSKI, S.; BARNHART, M.; AUGUSTE, G.; PINKNER, J. S.; BURLEIN, J.; BARREN, P.; KOENIG, S.; LEATH, S.; JONES, C. H.; HULTGREN, S. J. Prevention of Mucosal *Escherichia coli* Infection by FimH-Adhesin-Based Systemic Vaccination. **Science**, v. 276, n. 5312, p. 607-611, 1997.

LIU Y.Y.; WANG, Y.; WALSH, T.R.; YI, L.X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L.F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J.H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LOQUE, C.M.; DOETKOTT, C.; MANGIAMELE, P.; WANNEMUEHLER, Y.M.; JOHNSON, T.J.; TIVENDALE, K.A.; LI, G.; SHERWOOD, J.S.; NOLAN, L.K. Genotypic and phenotypic traits that distinguish neonatal meningitis-associated *Escherichia coli* from fecal *E. coli* isolates of healthy human hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5824-5830, 2012.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, p. 712-719, 2012.

MARTINEZ, J.J.; MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J.; Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO Journal**, v. 19, p. 2803-2812, 2000.

MASTERS, N.; WIEGAND, A.; AHMED, W.; KATOULI, M. *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. **Water Research**, v. 45, p. 6321-6333, 2011.

MCGUIRE, E.J.; BINKLEY, S.B. The Structure and Chemistry of Colominic Acid. **Biochemistry**, v. 3, n. 2, p. 247-251, 1964.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916-932, 2013.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M.; CURTISS, R.; BROWN, P. K.; ARNÉ, P.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J. M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

MIAJLOVIC, H.; SMITH, S. G. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 654, n. 2014, p. 1-9, 2014.

- MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E.Z. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 66-73, 2005.
- MOKRACKA, J.; KOCZURA, R.; KAZNOWSKI, A. Multiresistant Enterobacteriaceae with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 15, n. 46, p. 3353-3363, 2012. doi: 10.1016/j.watres.2012.03.037.
- MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 25-52, 1996.
- MULLER, S. I.; VALDEBENITO, M.; HANTKE, K. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of Salmonella. **Biometals**, v. 22, n. 4, p. 691-695, 2009.
- NICHOLS, K. B.; TOTSIKA, M.; MORIEL, D. G.; LO, A. W.; YANG, J.; WURPEL, D. J.; ROSSITER, A. E.; STRUGNELL, R. A.; HENDERSON, I. R.; ULETT, G. C. BEATSON, S. A.; SCHEMBRI, M. A. Molecular Characterisation of the Vacuolating Autotransporter Toxin in Uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 10, p. 1487-1498, 2016.
- NOWICKI, B.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n.1, p. S24-S27, 2001.
- OELSCHLAEGER, T. A.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Virulence factors of uropathogens. **Current opinion in Urology**, v. 12, p. 33-38, 2002.
- OLIVEIRA, F. A.; PALUDO, K. S.; AREND, L. N. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 4114-4125, 2011.
- OLIVEIRA, F.A. **Característica de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos em estirpes de *Escherichia coli* uropatogênica**. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- OSIŃSKA, A.; KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M.; NIESTĘPSKI, S. The prevalence of virulence genes specific for *Escherichia coli* in wastewater samples from wastewater treatment plants with the activated sludge process. **E3S Web of Conferences**, v. 44, n. 00133, 2018. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20184400133>
- PANDEY, P.K.; KASS, P.H.; SOUPIR, M.L.; BISWAS, S.; SINGH, V.P. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. **AMB Express**, v. 4, n. 51, p. 1-16, 2014.
- PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5087-5096, 2003.

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

PETTIGREW, D.; ANDERSON, K. L.; BILLINGTON, J.; COTA, E.; SIMPSON, P.; URVIL, P.; RABUZIN, F.; ROVERSI, P.; NOWICKI, B.; DU MERLE, L.; LE BOUGUENEC, C.; MATTHEWS, S.; LEA, S. M. High resolution studies of the Afa/Dr adhesion DraE and its interaction with chloramphenicol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46851-46857, 2004.

PITEAU, M.; PAPANATHODOROU, P.; SCHWAN, C.; SCHLOSSER, A.; AKTORIES, K.; SCHMIDT, G. Lu/BCAM Adhesion Glycoprotein Is a Receptor for *Escherichia coli* Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1). **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003884, 2014.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 9, 2012.
POUTTU, R.; WESTERLUND-WIKSTROM, B.; LANG, H.; ALSTI, K.; VIRKOLA, R.; SAARELA, U.; SIITONEN, A.; KALKKINEN, N.; KORHONEN, T. K. *matB*, a Common Fimbrillin Gene of *Escherichia coli*, Expressed in a Genetically Conserved, Virulent Clonal Group. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4727-4736, 2001.

PROVENCE, D.L.; CURTISS, R. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 11, p. 4460-4467, 1992.

PRÜSS-USTÜN, A.; BARTRAM, J.; CLASEN, T.; COLFORD, J.M.; CUMMING, O.; CURTIS, V.; BONJOUR, S.; DANGOUR, A.D.; DE FRANCE, J.; FEWTRELL, L.; FREEMAN, M.C.; GORDON, B.; HUNTER, P.R.; JOHNSTON, R.B.; MATHERS, C.; MÄUSEZAHN, D.; MEDLICOTT, K.; NEIRA, M.; STOCKS, M.; WOLF, J.; CAIRNCROSS, S. Burden of disease from inadequate water, sanitation and hygiene in low and middle income settings: a retrospective analysis of data from 145 countries. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, p. 894-905, 2014. doi:10.1111/tmi.12329.

PYNEGAR, E.L.; JONES, J.P.G.; GIBBONS, J.M.; ASQUITH, N.M. The effectiveness of Payments for Ecosystem Services at delivering improvements in water quality: lessons for experiments at the landscape scale. **PeerJ**, 6:e5753, 2018. doi:10.7717/peerj.5753.

RAMOS, N. L.; DZUNG, D. T.; STOPSACK, K.; JANKÓ, V.; POURSHAFIE, M. R.; KATOULI, M.; BRAUNER, A. Characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* from children with urinary tract infection in different countries. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 12, p. 1587-1593, 2011.

REIGSTAD, C. S.; HULTGREN, S. J.; GORDON, J. I. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial

communities are assembled. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 29, p. 21259-21267, 2007.

RIBIC, R.; MESTROVIC, T.; NEUBERG, M.; KOZINA, G. Effective anti-adhesives of uropathogenic *Escherichia coli*. **Acta Pharmaceutica**, v. 68, n.1, p. 1-18, 2017.

RILEY L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 380–390, 2014. 10.1111/1469-0691.12646.

RIOS, S.; AGUDELO, R.; GUTIERREZ, L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. **Facultad Nacional de Salud Pública**, v. 35, n. 2, p. 236-247, 2017. doi: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.

ROBINSON, A. E.; HEFFERNAN, J. R.; HENDERSON, J. P. The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. **Future Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 745-756, 2018.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 449-456, 2003.

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

SABRI, M.; LÉVEILLÉ, S.; DOZOIS, C.M. A *SitABCD* homoLOQUE from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. **Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 745-758, 2006.

SANTOS, A. C. M.; ZIDKO, A. C. M.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C.; SILVA, R. M. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SAVIOLLI, J.Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SCALETSKY, I.C.A.; SOUZA, T.B.; ARANDA, K.R.S.; OKEKE, I.N. Multiresistant Enterobacteriaceae with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 15, n. 46, p. 3353-3363, 2012.

SCHOULER, C.; SCHAEFFER, B.; BRÉE, A.; MORA, A.; DAHBI, G.; BIET, F.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, J.; MOULIN-SHOULER, M. Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1673-1678, 2012.

- SILVA, E. A. Infecções urinárias de origem bacteriana diagnosticadas em Umuarama-PR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n.1, p. 59-61,2007.
- SILVA, G. J.; MENDONÇA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, v. 3, p. 18-28, 2012.
- SINGH, C.; SINGH, J.S.; KUMAR, V.; CHANDRA, R.; KUMAR, N. Screening out of coliform bacteria from different location of Gomati River in Lucknow. **African Journal of Microbiology**, v. 7, n. 29, p. 3762-3771, 2013.
- SMITH, J. R.; FRATAMICO, P. N.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.
- SPURBECK, R. R.; DINH, P. C. JR.; WALK, S. T.; STAPLETON, A E.; HOOTON, T. M.; NOLAN, L. K.; KIM, K. S.; JOHNSON, J. R.; MOBLEY, H. L. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 12, p. 4115-4122, 2012.
- STAMM, W. E. Host-pathogen interactions in community-acquired urinary tract infections. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 117, p. 75-84, 2006.
- STAPLETON, A.; HOOTON, T. M.; FENNELL, C.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. Effect of secretor status on vaginal and rectal colonization with fimbriated *Escherichia coli* in women with and without recurrent urinary tract infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. 717-720, 1995.
- SUBASHCHANDRABOSE, S.; MOBLEY, H. L. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 4, p. 1-20, 2015.
- SVENSON, S. B.; KÄLLENIUS, G.; MÖLLBY, R.; HULTBERG, H.; KORHONEN, T. K.; WINBERG, J. P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: Identification and chemical characterization of receptors. **Infection**, v. 11, p. 61-67, 1983.
- SZEMIAKO, K.; KRAWCZYK, B.; SAMET, A.; SLEDZINSKA, A.; NOWICKI, B.; NOWICKI, S.; KUR, J. A subset of two adherence systems, acute pro-inflammatory *pap* genes and invasion coding *dra*, *fim*, or *sfa*, increases the risk of *Escherichia coli* translocation to the bloodstream. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.32, n. 12, p. 1579-1582, 2013.
- TERLIZZI, M. E.; GRIBAUDO, G.; MAFFEI, M. E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1566, p. 1-23, 2017.
- THANKAVEL, K.; MADISON, B.; IKEDA, T.; MALAVIYA, R.; SHAH, A. H.; ARUMUGAM, P. M.; ABRAHAM, S. N. Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n.5, p. 1123-1136, 1997.

THOMASSIN, J. L.; BRANNON, J. R.; GIBBS, B. F.; GRUENHEID, S.; LE MOUAL, H. OmpT outer membrane proteases of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* contribute differently to the degradation of human LL-37. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 2, p. 483-492, 2012.

TOKANO, D. V.; KAWAICHI, M. E.; VENANCIO, E. J.; VIDOTTO, M. C. Cloning and characterization of the iron uptake gene *iutA* from avian *Escherichia coli*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p. 473-482, 2008.

ULETT, G.C.; TOTSIKA, M.; SCHAALE, K.; CAREY, A.J.; SWEET, M.J.; SCHEMBRI, M.A. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 100–107, 2013

VAN LOY, C. P.; SOKURENKO, E. V.; MOSELEY, S. L. The major structural subunits of Dr and F1845 fimbriae are adhesins. **Infection and Immunity**, v. 70, p.1694-1702, 2002.

VANDEPUTTE-RUTTEN, L.; KRAMER, R. A.; KROON, J.; DEKKER, N.; EGMOND, M. R.; GROS, P. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. **EMBO Journal**, v. 20, n.18, p.5033-5039, 2001.

WANG, A.; NIZRAN, P.; MALONE, M.A.; RILEY, T. Urinary tract infections. **Primary Care**, v. 40, p. 687-706, 2013.

WARREN, J. W.; MOBLEY, H. L.; TRIFILLIS, A. L. Internalization of *Escherichia coli* into human renal tubular epithelial cells. **Journal of Infection Diseases**, v. 158, p. 221-223, 1988.

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 7, p. 600-605, 2009.

WELCH, R. A. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 521-528, 1991.

WELCH, R. A. Uropathogenic *Escherichia coli*-associated exotoxins. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, 2016.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, p. 11-19, 2008.

World Health Organization (WHO) and the United Nations Children’s Fund (UNICEF) (2017). Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene: 2017 **Update and SDG Baselines**, Geneva. Licence. <https://www.who.int/en/news-room/detail/12-07-2017-2-1-billion-people-lack-safe-drinking-water-at-home-more-than-twice-as-many-lack-safe-sanitation>. Acesso em: 27.06.2019.

WRIGHT, K. J.; SEED, P. C.; HULTGREN, S. J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 2230-2241, 2007.

WU, X. R.; SUN, T. T.; MEDINA, J. J. *In vitro* binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 9630-9635, 1996.

WULLT, B.; BERGSTEN, G.; SAMUELSSON, M.; GEBRETSADIK, N.; HULL, R.; SVANBORG, C. The role of P fimbriae for colonization and response induction in the human urinary tract. **Journal of Infection Diseases**, v. 183, n. 1, S43-46, 2001.

YAMAMOTO, S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 13, p. 68-73, 2007.

4 TRABALHO CIENTÍFICO

Virulence factors of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in samples of water for human consumption in southern Brazil

Running title: ExPEC in samples of water for human consumption

Angélica Marim Lopes*¹, Anahí Lara Klein¹, Caroline Rodrigues da Silva¹, Kawana Hiromori Macedo¹, Daniele Zandrini Rechenchoski², Jacinta Sanchez Pelayo¹.

¹ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

² Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

* Corresponding author: angelicadambrozio@gmail.com

Abstract

The water is an important diseases transmission medium to human and animals. The aim of this paper was verify if the water is a potential source of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) through the specific molecular markers. ExPEC related genes were present in 75.2% of the 250 *E. coli* positive samples, of which 17.5% included isolates with genotypic characteristics of Avian Pathogenic *E. coli* (*iutA*, *iroN*, *hlyF*, *iss* e *ompT*). The genes most prevalent were *fimH* and *fyuA*, being identified 62.8% and 59.8% of isolates, respectively. Also presented high frequency, *iutA* and *traT*, being detected in 57.4% and 52.1% of

isolates, respectively. The genes *iroN*, *papC*, *papG*, *hlyF*, *ibeA*, *iss*, *sitA*, *ompT*, *cnf1* and *cnf2* were found with lower frequency than 20%. The *hlyA*, *sfa/focDE* were genes less prevalent on this study. All isolates were negative for the other two genes investigated *afa/draBC* e *kpsMT K1*. The phylogenetic group B2 and aggregative standard were predominant on these samples. Moreover, was observed that 142 (75.5%) of isolates formed biofilm. Thus, it was possible to demonstrate that ExPEC are important pathogens on water contamination for human consumption and better understand the implications that this reservoir may bring to public health.

Key words: diseases, ExPEC, genes, virulence, water.

Introduction

The population growth and industry expansion brought as consequence the commitment of rivers, lakes and reservoirs waters, being affected by the most variable types of microorganisms (Cabral 2010). Thus, water is considered an important transmission medium of diseases to human and animals, being *Escherichia coli* of great clinical importance, which turns primordial its search on consumption water (Cabral 2010; Ebomah *et al.* 2018).

Stem from genetic modifications during evolution of its clones, the strains of *E. coli* were classified in two groups: the related with enteric clinical manifestations, denominated Diarrhogenic *E. coli* (DEC) and the associated with extraintestinal infections (ExPEC). In human, ExPEC may occur in all age groups and affect diverse organs, being responsible for important pathological conditions as sepsis, neonatal meningitis, bacteremia, osteomyelitis, cellulites, cystitis, pyelonephritis and prostatitis (Santos *et al.* 2009; Bélanger *et al.* 2011; Pitout 2012).

In terms of morbidity and mortality, ExPEC has a huge impact under public health with annual economic cost of billions of dollars (Russo & Johnson 2003). It is worth to highlight the importance in hospital environment, where affect patients already debilitated and immunologically depressed (Kumarasamy *et al.* 2010).

Although its relevance, there was intensification on studies of genetic virulence markers, with the aim of better characterize its virulence mechanisms (Ewers *et al.* 2007; Santos *et al.* 2009). Between the principal virulence factors presented by ExPEC are adhesins, invasines, toxins, capsule, serum resistance mechanisms and iron caption systems (Schouler *et al.* 2012).

While the ExPEC group is more commonly found as commensal in healthy human, the presence of this *E. coli* group in water may be a potential health issue for population. Accordingly, it was necessary to realize this research, in order to verify if the water is a potential source of ExPEC and thus, better understand the implications which this group of *E. coli* may bring to public health and through these results, improve the microbiological quality of water.

METHODS

Sampling

The study was realized at city of Londrina, Paraná state – Brazil. Londrina is located in south Brazil, with 1652 km² of area and population estimated of 569733 habitants, being considered an important industrial and commercial hub in the north of state.

A total of 750 samples of water for human consumption were collected between January, 2012 and December, 2014 provide from alternative

supplies solutions like artisans wells, shallow wells, sources and mines, which did not have any type of treatment.

The properties were randomly chosen by sanitary surveillance technicians and the samples were collected only once from each property, always with the inspection of sanitary surveillance technicians. The samples were collected in 500 mL sterile glass vials and transported in chilled isothermal boxes to the laboratory where they were stored at 4 °C until analyzed. The time span from collection to analysis did not exceed 6 hours.

Research, Isolation and Identification of *E. coli*

The technique used for the detection of *E. coli* was the method Colilert (IDEXX Laboratories, Sovereign, USA), in accordance with methodology approved by the USEPA (2017), as described by Schuroff *et al.* (2014). After incubation of the Quanti-Tray cartons (WP2000), *E. coli* was determined according to the manufacturer's instructions.

For the isolation of the *E. coli* strains, the carton wells that displayed changes in the media color to yellow and acquired blue-fluorescent coloration against UV light were used to seed MacConkey agar plates (Difco®, USA) and incubated at 37 °C for 24 hours. After incubation, three colonies from each plate demonstrating presumptive characteristics of *E. coli* were submitted for biochemical identification using EPM, MILi, and Simmons Citrate media (Probac, BR). Isolates biochemically identified as *E. coli* were stored at -80 °C in heart and brain infusion broth (BHI; Difco®, USA) containing 20% (v/v) glycerol (Sigma, USA).

Adherence assay

The adherence test was realized in HEp-2 cells according to the technique described by Cravioto *et al.* (1979). The assay was performed allowing 6 hours of bacterial–cell interaction and then evaluated using light microscopy.

Biofilm formation test

Biofilm formation was evaluated using the method described by Wakimoto *et al.* (2004). Biofilm formation was considered positive when the optical density at 570 nm (OD₅₇₀) was greater than 0.2 OD units. EAEC strain 042 was used as a positive control and *E. coli* HB101 (*E. coli* K-12) was used as a negative control.

Detection of virulence genes through PCR

DNA was extracted from the bacterial isolates by boiling, as previously described by Lascowski *et al.* (2012). The supernatants containing the DNA were then used for the identification of the ExPEC strains and their classification into phylogenetic groups. Isolates of *E. coli* obtained from water samples were analyzed for five genes. Besides them, others virulence factors characteristics of ExPEC (*papC*, *papG*, *fimH*, *tsh*, *hlyA*, *cnf1*, *cnf2*, *ibeA*, *fyuA*, *sitA*, *traT*, *afa/draBC*, *kpsMT K1* and *sfa/focDE*) were tested on bacterial isolates as per proposed by Bouguénec *et al.* (1992); Yamamoto *et al.* (1995); Blanco *et al.* (1996); Dozois *et al.* (2000) and Johnson & Steel (2000). Besides these virulence genes, it was searched the *shf* gene (Czeczulin *et al.* 1999) to verify a possible relation with biofilm production. The characteristics of initiators oligonucleotides are represented on Table 1.

Table 1 – Sequence of searched oligonucleotides and fragment size of amplified DNA

Gene	Oligonucleotides Sequence (5'→3')	Fragment(pb)	Reference
<i>iutA</i>	(F) GGCTGGACATCATGGGAACTGG (R) CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	Johnson <i>et al.</i> (2008)
<i>iroN</i>	(F) AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT (R) GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	553	Johnson <i>et al.</i> (2008)
<i>hlyF</i>	(F) GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCCTTACC (R) GCGGTTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	Johnson <i>et al.</i> (2008)
<i>ISS</i>	(F) CAGCAACCCGAACCACTTGATG (R) AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	Johnson <i>et al.</i> (2008)
<i>ompT</i>	(F) TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT (R) TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	Johnson <i>et al.</i> (2008)
<i>papC</i>	(F) GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG (R) ATATCCTTTCTGCAGGCAGGGTGTGGC	328	Le Bouguéneq <i>et al.</i> (1992)
<i>papG</i>	(F) CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG (R) ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	1070	Johnson & Steel (2000)
<i>fimH</i>	(F) TGCAGAACGGATAAGCCGTGG (R) GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	Johnson & Steel (2000)
<i>Tsh</i>	(F) GGTGGTGCCTGGAGTGG (R) AGTCCAGCGTGATAGTGG	640	Dozois <i>et al.</i> (2000)
<i>hlyA</i>	(F) AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGC (R) ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTC	1177	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>cnf1</i>	(F) AGGATGGAG TTT CCT ATGCAGGAG (R) CATTCCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	498	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>cnf2</i>	(F) AATCTAATTAAGAGAAC (R) CATGCTTTGTATATCTA	543	Blanco <i>et al.</i> (1996)
<i>ibeA</i>	(F) AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC (R) TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170	Johnson & Steel (2000)
<i>fyuA</i>	(F) TGATTAACCCCGCGACGGAA (R) CGCAGTAGGCACGATCTTGTA	880	Johnson & Steel (2000)
<i>sitA</i>	(F) AGGGGGCACAACCTGATTCTCG (R) TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	608	Johnson & Steel (2000)
<i>traT</i>	(F) GGTGTGGTGCATGAGCACAG (R) CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290	Johnson & Steel (2000)
<i>afa/draBC</i>	(F) GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC (R) CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	559	Johnson & Steel (2000)
<i>kpsMT K1</i>	(F) TAGCAAACGTTCTATTGGTGC (R) CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	150	Johnson & Steel (2000)
<i>sfa/focDE</i>	(F) CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC (R) CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	Le Bouguéneq <i>et al.</i> (1992)
<i>Shf</i>	(F) ATGAATTCCACTTTCTCCCGAGACATTC (R) ATGTCGACCCTTTAGCGGGAGCATTTCAT	613	Czczulin <i>et al.</i> (1999)

Source: done by the author.

The gene detection was performed using polymerase chain reaction (PCR) amplification of the specific target genes on a GeneAmp® PCR System 9,700 thermocycler (Applied Biosystems, USA). Each of the bacterial DNA amplification reactions contained 2 µL of the bacterial-DNA lysate, 0.2 mM dNTPs, 2.0 mM MgCl₂, 20 pmol of each oligonucleotide primer, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 1× reaction buffer, and sterile Milli-Q (Millipore) water at a final volume of 25 µL. Seven microliters of the amplified product was analyzed by 1.5% - 2% agarose gel electrophoresis (Invitrogen™) using Tris Borate EDTA (TBE) buffer. A 100 bp ladder (Invitrogen™) was used as a molecular size marker. The gels were stained with Sybr Safe solution (Invitrogen™) and visualized under ultraviolet light transillumination (Vilbert Loumart). The positive results will correspond to the band (base pairs) of same height of the standard strain band amplified. As positive controls for searched genes were used RS218 (ExPEC isolated from neonatal meningitis) J96 (ExPEC isolated from pyelonephritis), EC40 and strain 042 (O44:H18; adhesion aggregative standard). As negative control was used for all the tests the strain HB101 (*E. coli* k-12) (Boyer & Roulland-Dussoix 1969).

Determination of phylogenetic groups

The strains positive for the ExPEC virulence genes were subsequently tested by PCR for the presence of the genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, and *trpA* and for the DNA fragment TSPE4.C2. The results were used for characterization of the strains relative to the phylogenetic groups A, B1, B2, C, D, E, and F according to Clermont *et al.* (2013) (Table 2).

Table 2 – Oligonucleotides sequences used for determination of phylogenetic group

Gene	Sequency (5'→3')	Size (pb)	Reference
<i>arpA</i>	(F) AACGCTATTCGCCAGCTTGC (R) TCTCCCCATACCGTACGCTA	400	Clermont <i>et al.</i> (2013)
<i>chuA</i>	(F) ATGGTACCGGACGAACCAAC (R) TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	Clermont <i>et al.</i> (2013)
<i>yjaA</i>	(F) CAAACGTGAAGTGTCAGGAG (R) AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	Clermont <i>et al.</i> (2013)
TspE4. C2	(F) CACTATTCGTAAGGTCATCC (R) AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC	152	Clermont <i>et al.</i> (2013)

Source: done by the author.

Statistical Analysis

The statistics analyses were realized using the exact Fisher test, the qui-square test and the U test of Mann-Whitney. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Presence of *E. coli*

From the 750 water samples collected, 250 (33.3%) were contaminated with *E. coli*. From the 250 water samples positive for *E. coli*, 578 *E. coli* isolates were evaluated for the presence of ExPEC genes.

Virulence Factors identification

From the 578 isolates only one strain was accounted in the results because present the same genotypic and phenotypic characteristics. Then, ExPEC related genes were present in 75.2% of the 250 *E. coli* positive samples, of which 17.5% included isolates with genotypic characteristics of APEC (*iutA*, *iroN*, *hlyF*, *iss* e *ompT*). The most prevalent genes were *fimH* e *fyuA*, being identified in 62.8% and 59.8% of isolates, respectively. The genes *iutA* and *traT* also presented high frequency, being detected in 57.4% and 52.1% of isolates, respectively. The genes *iroN*, *papC*, *ompT*, *hlyF*, *papG*, *ibeA*, *iss*, *sitA*, *cnf1* and *cnf2* were found in less frequency than 20%. The *hlyA*, *sfa/focDE* were genes less prevalent on this, both detected in only 5.3% of isolates, followed by gene *tsh* (1.2%). All isolates were negative for the other two genes investigated *afa/draBC* e *kpsMT K1*. Description and distribution of genes investigated is shown in Table 3.

Table 3 – Frequency of ExPEC associated virulence genes (PCR screening)

Virulence Genes	Comment	Frequency
<i>fimH</i>	Fimbriae compound of type I	62.8%
<i>fyuA</i>	Yersiniabactin receptor	59.8%
<i>iutA</i>	Ferric aerobactin receptor gene	57.4%
<i>traT</i>	Gene encoding complement resistance protein	52.1%
<i>iss</i>	Increased serum survival gene	19.1%
<i>iroN</i>	Synthesis of siderophore salmochelins receptors	18.6%
<i>ompT</i>	Code the production of proteins from outer membrane	18%
<i>hlyF</i>	Hemolysin producer	18%
<i>cnf2</i>	Gene encoding the cytotoxic necrotizing factor 2	17%
<i>cnf1</i>	Gene encoding the cytotoxic necrotizing factor 1	15.9%
<i>papG</i>	Fimbriae P	14.9%
<i>papC</i>	P-fimbriae outer membrane usher protein gene	12.76%
<i>ibeA</i>	Invasion protein gene	7.9%
<i>sitA</i>	Iron/manganese transport system periplasmic binding protein gene	7.9%
<i>hlyA</i>	Hemolysin producer	5.3%
<i>sfa/focDE</i>	S-fimbrial adhesin gene	5.3
<i>tsh</i>	Temperature-sensitive hemagglutinin	1.2%
<i>afa/draBC</i>	Adhesin	ND*
<i>kpsMT K1</i>	Capsule synthesis	ND*

Source: done by the author. *No detected.

At last, the gene *shf* was found in only four (2.1%) samples, being also positive with the phenotype of aggregative standard in cell culture HEp-2 for genes of ExPEC (Table 4).

Phylogenetic classification

All the phylogenetic groups were identified in this study, being that B2 group included the majority of the isolates (44.9%), followed by A (32.9%), B1 (11.7%), D (4.7%), E (5.8%). Through the obtained results, it is possible to conclude that the proportion of samples belonged to B2 group was significantly higher than the other groups ($p < 0.001$).

Adherence in HEp-2 cells

All the positive samples for some genes of ExPEC were submitted to adhesion test in cell HEp-2. On 188 searched samples, 152 (81%) adhere the aggregative mode (AA), 23 (12%) presented an undefined standard (IND), 3 (1.6%) expressed the phenotype of adhesion diffusion (AD) and 10 (5.31%) were not adherent to cells HEp-2. Therefore, the incidence of aggregative adhesion was about 81%, being the aggregative standard significantly predominant on the analyzed samples of water ($p < 0.001$).

Biofilm

In the biofilm formation test, the samples were classified in two groups based on their absorbance values: group 1 ($OD_{570} > 0.2$) with 142 (75.5%) samples and group 2 ($OD_{570} \leq 0.2$) with 46 (24.5%) samples. The incidence of virulence factors of ExPEC was significantly higher on group 1 than group 2 ($p <$

0.001). On genes search, all the samples *shf* positive were biofilm formed ($OD_{570} > 0.2$) (Table 4).

Table 4 – Incidence of factors from 2 or more virulence factors of ExPEC and *shf* on each absorbance group.

Group	OD ₅₇₀	Nº	ExPEC(%)	<i>shf</i> (%)
1	> 0.2	142	75.5	4 (2.5)
2	≤ 0.2	46	24.5	0 (0)
Total		188	100	4 (1.6)

OD₅₇₀, optical density at 570 nm; ExPEC, Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*

* P < 0.001.

DISCUSSION

In this paper, we respond to investigated the presence of virulence factors of ExPEC from water obtained from alternative sources. In a study conducted in France by Diallo *et al.* (2013), water samples were analyzed as of a treatment station of residual waters were analyzed and between the strains of *E. coli* investigated, the most prevalent and potentially pathogen was ExPEC. Another study developed by Masters *et al.* (2011), in Australia, analyzed the virulence genes associated with ExPEC in freshwater and was detected the presence of strains with ExPEC virulence characteristics, just as, in another study, realized by Hamelin *et al.* (2006) in aquatic systems of two rivers localized on Canada, that also detected the presence of these strains. In Brazil, there are few papers that relate the probably reservoirs associated with ExPEC, principally in water for human consumption.

Strains of ExPEC have specific virulence factors that give them a capability to survive in different niches outside their normal intestinal environment,

such as in mammals as in birds (Mellata *et al.* 2003). Many genes associated with the virulence have been identified in ExPEC, between them, (I) adhesins *papC* and *papG* (fimbriae P), *fimH* (fimbriae compound of type I); *tsh* (hemagglutinin temperature-sensitive); (II) systems of iron caption – *iroN* (synthesis of siderophore salmoquelina receptors), *iutA* (synthesis of siderophore aerobactin), *fyuA* (yersiniabactin receptor) and *sitA* (periplasmic protein iron-binding); (III) proteases – *ompT* (code the production of proteins from outer membrane); (IV) invasins – *ibeA* (invader protein); (V) resistant to serum – *iss* and *traT* (serum resistance), (VI) toxins - *hlyF* and *hlyA* (hemolysin producer), *cnf1* and *cnf2* (necrotizing cytotoxic factor type 1 and 2) (Bélanger *et al.* 2011; Ewers *et al.* 2007; Johnson & Steel 2000; Johnson *et al.* 2008).

In our studies, 17.5% of the isolates were considered as potential APEC for harboring APEC pentaplex genes, as suggested by Johnson *et al.* (2008). Studies show a strict relation between human ExPEC and APEC. The presence of virulence genes in common and phylogenetic standards, indicate a relation between APEC and human ExPEC (Mora *et al.* 2013; Moulin-Schouleur *et al.* 2007). Skyberg *et al.* (2006) showed in their study that commensal strains that received APEC plasmids were capable to grown in human and mouse urine, what suggest that these plasmids are gene reservoir bind to urovirulence. Ewers *et al.* (2007) suggest that APEC is a vehicle or a reservoir for many virulence genes of human ExPEC (UPEC e NMEC), being APEC considered a zoonotic agent.

Other genes investigated were found among isolates of *E. coli* (*papC*, *papG*, *fimH*, *tsh*, *hlyA*, *cnf1*, *cnf2*, *ibeA*, *fyuA*, *sitA*, *traT*, e *sfa/focDE*). The *fimH* and *fyuA* genes were found in higher proportions, followed by *iutA* e *traT*, respectively. Isolates Type 1 pili encoded by *fimH* gene plays an important role in host-pathogen

(Schwartz *et al.* 2013). Its expression increases UPEC virulence because the pathogen adheres in its invasion in bladder epithelial cells (Martinez *et al.* 2000). A number of different studies have described the correlation of different sets of virulence genes with pathogenic strains and/or as independent predictors for ExPEC infections. Thus, Lee *et al.* (2010) found that among commensal strains, *hlyA*, *fyuA*, *traT* and *iutA* were good predictors for urinary tract or blood stream infections, while Peirano *et al.* (2013) defined isolates positive for two or more of *papA* and/or *papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *kpsM II* and *iutA* as ExPEC. Lower proportions of genes *iroN*, *papC*, *papG*, *ibeA*, *iss*, *sitA*, *cnf1* e *cnf2* were found, followed by *hlyA*, *sfa/focDE* and *tsh*, less prevalent genes on this study.

Through the adhesion test in cells HEp-2 detected a large occurrence of virulence factors of ExPEC associated with the aggregative adhesion standard (AA) (81%). The high presence of samples possessors of phenotype AA also is described in studies conducted with *E. coli* obtained of environmental samples from our region (Lascowski *et al.* 2012; Puño-Sarmiento *et al.* 2014). We believe that this phenotype is extremely useful on bacterial resistance to the environment, thus allowing the colonization of water plumbing and reservoirs.

The biofilm formation also was analyzed in strains that presented ExPEC virulence factors. In our study, 75.5% of samples showed to be formed biofilm ($OD_{570} > 0.2$). The high level of samples biofilm formers may also be related to its origin. Being from aquatic origin, they naturally tend to form a biofilm more intense with the aim of facilitate the permanence and survive in the environment (Wingender & Flemming 2011). Also was verified between the samples the positivity of *shf* gene, highlighting the biofilm formation more intense when compared to the others samples. The gene *shf* has been used, although its relation with the biofilm

formation is still controversial (Mohamed *et al.* 2007; Fujiyama *et al.* 2008; Wani *et al.* 2012), we believe that our data come to contribute with information more accurate about the gene role in the biofilm formation on environment sources.

The phylogenetic analysis is closely related to the virulence properties of *E. coli* (Clermont *et al.* 2013). ExPEC are distinct phylogenetically of commensal *E. coli* and DEC, because pathogen ExPEC strains belong principally to B2 group and in low frequency to group D (Ewers *et al.* 2007; Mellata *et al.* 2003), whereas commensal strains are, largely, in the phylogenetic group A and B1 (Tenailon *et al.* 2010). Some studies suggest that ExPEC samples belonging to groups A and B1, generally have little virulence factors, while samples belonging to the groups B2 and D, harbor a larger number of virulence genes (Ewers *et al.* 2007). Rodriguez-Siek *et al.* (2005) demonstrated that the majority of APEC strains belonged to group A (38%), whereas most of UPEC strains belonged to group B2 (65%). The distribution of our isolates between phylogenetic groups showed that the majority belonging to the phylogenetic groups B2 and A that in the case of this last one group included positive samples for genes that characterized APEC, followed by a low number of isolates to group B1, D and E. Thus, there is relationship between the phylogenetic group and strains harboring virulence genes present in our studies. The analyzes in our study corroborate other studies involving the phylogenetic groups and virulence factors (Ewers *et al.* 2007; Kobayashi *et al.* 2011).

CONCLUSIONS

According to our results the presence of ExPEC in water for human consumption, may be a potential health issue for the population. Thus, more studies

to investigate the occurrence of ExPEC in waters for human consumption are necessary to better comprehend the implications that this reservoir may bring to public health and through these results, improve the microbiological quality of water. We emphasize the need for changes in the policies and behavior of the population that uses these water sources. In addition, knowledge regarding the presence of these pathogens should serve to alert the regulatory agencies, health officials, and educators, the potential drivers for appropriate interventions and reassessment of current contamination and disease prevention strategies.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Laboratory of Virology at the State University of Londrina for supplying HEp-2 cell cultures, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

REFERENCES

- Bélangier, L.; Garenaux, A.; Harel, J.; Boulianne, M.; Nadeau, E.; Dozois, C. M. 2011 *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **62** (1), 1-10.
- Blanco, M. Blanco, J. E.; Blanco, J.; Alonso, M. P; Balsalobre, C.; Mouriño, M.; Madrid, C.; Juárez, A. A. 1996 Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). *Journal of Microbiological Methods*, **26** (1-2), 95-101.
- Bouguéneq, C.; Archambaud, M.; Labigne, A. 1992 Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in Uropathogenic *Escherichia coli*

- strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **30** (5), 1189-1193.
- Boyer H. W. & Roulland-Dussoix, D. A. 1969 Complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, **14** (41), 459-472.
- Cabral, J.P.S. 2010 Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal Environmental Research and Public Health*, **7** (10), 3657-3703.
- Clermont, O.; Christenson, J. K; Denamur, E.; Gordon, D. M. 2013 The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology*, **5** (1), 58-65.
- Cravioto, A.; Gross, R. J; Scotland, S. M.; Rowe, B. 1979 An Adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology*, **3** (2), 95-99.
- Czczulin, J. R.; Whittam, T. S.; Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Nataro, J. P. 1999 Pylogenetic analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, **67** (6), 2692-2699.
- Diallo, A. A.; Brugère. H.; Kérourédan, M.; Dupouy, V.; Toutain, P. L.; Bousquet-Mélou, A.; Oswald, E.; Bibbal, D. 2013 Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase- producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater. *Water Research*, **47** (13), 4719-4729.
- Dozois, C. M.; Dho-Moulin, M.; Brée, A.; Fairbrother, J. M; Desautels, C.; Curtiss, R. 2000 Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of Avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infection and Immunity*, **68** (7), 4145-4154.
- Ebomah, K.E.; Adefisoye, M.A.; Okoh, A.I. 2018 Pathogenic *Escherichia coli* strains recovered from selected aquatic resources in the Eastern Cape, South Africa, and its significance to public health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **15**, (7), 1506. doi: 10.3390/ijerph15071506.
- Ewers, C.; Li, G.; Wilking, H.; Kiessling, S.; Alt, K.; Antão, E. M.; Laturnus, C.; Diehi, I.; Glodde, S.; Homeier, T.; Bohnke, U.; Steinruck, H.; Philipp, H. C.; Wieler, L. H. 2007 Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, **297** (3), 163-176.
- Fujiyama, R.; Nishi, J.; Imuta, N.; Tokuda, K.; Manago, K.; Kawano, Y. 2008 The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of Enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. *Current Microbiology*, **56** (5), 474-480.
- Hamelin, K.; Bruant, G.; El-Shaarawi, A.; Hill, S.; Edge, T. A.; Bekal, S.; Fairbrother, J. M; Harel, J.; Maynard, C.; Masson, L.; Brousseau, R. 2006 A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes

in *Escherichia coli* isolates from Great Lakes recreational waters. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (6), 4200-4206.

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. *The Journal of Infectious Diseases*, **181** (1), 261-272.

Johnson, T. J.; Wannemuehler, Y.; Doetkott, C.; Johnson, S. J.; Rosenberger, S. C.; Nolan, L.K. 2008 Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, **46** (12), 3987-3996.

Kobayashi, R.K., Aquino, I., Ferreira, A.L., Vidotto, M.C. 2011 EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of Avian Pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in southern Brazil. *Foodborne pathogens and disease*, **8** (5), 631-634. doi: 10.1089/fpd.2010.0726.

Kumarasamy, K.K.; Toleman, M.A.; Walsh, T.R.; Bagaria, J.; Butt, F.; Balakrishnan, R.; Chaudhary, U.; Doumith, M.; Giske, C.G.; Irfan, S.; Krishnan, P.; Kumar, A.V.; Maharjan, S.; Mushtaq, S.; Noorie, T.; Paterson, D.L.; Pearson, A.; Perry, C.; Pike, R.; Rao, B.; Ray, U.; Sarma, J.B.; Sharma, M.; Sheridan, E.; Thirunarayan, M.A.; Turton, J.; Upadhyay, S.; Warner, M.; Welfare, W.; Livermore, D.M.; Woodford, N. 2010 Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, **10** (9), 597-602.

Lascowski, K. M. S.; Guth, B. E. C.; Martins, F. H.; Rocha, S. P. D.; Irino, K.; Pelayo, J. S. 2012 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, **114** (4), 1230-1239.

Lee, S., Yu, J. K., Park, K., Oh, E. J., Kim, S. Y., Park, Y. J. 2010 Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with bla_{CTX-M}. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **40** (4), 361-367.

Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal*, **19** (12), 2803-2812. doi: 10.1093/emboj/19.12.2803.

Masters, N.; Wiegand, A.; Ahmed, W.; Katouli, M. 2011 *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. *Water Research*, **45** (19), 6321-6333.

Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C.M., Curtiss, R., Brown, P.K., Arne, P., Brée, A., Desautels, C., Fairbrother, J.M. 2003 Role of virulence factors in resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infection and Immunity*, **71** (1), 536-540. doi: 10.1128/IAI.71.1.536-540.2003.

Mohamed, J. A.; Huang, D. B.; Jiang, Z. D.; Dupont, H. L.; Nataro, J. P.; Belkind-Gerson, J.; Okhuysen, P. C. 2007 Association of putative Enteroaggregative

Escherichia coli virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *Journal Clinical Microbiology*, **45** (1), 121–126.

Mora, A. Viso, S.; López, C.; Alonso, M. P.; García-Garrote, F.; Dabhi, G.; Mamani, R.; Herrera, A.; Marzoa, J.; Blanco, M.; Blanco, J. E.; Moulin-Schouleur, M.; Schouler, C.; Blanco, J. 2013 Poultry as reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, **167** (3), 506-512.

Moulin-Schouleur, M., Reperant, M., Laurent, S., Bree, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., Schouler, C. 2007 Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, **45** (10), 3366-3376. doi: 10.1128/JCM.00037-07.

Peirano, G., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., Pitout, J. D. 2013 Virulence potential and adherence properties of *Escherichia coli* that produce CTX-M and NDM β -lactamases. *Journal of Medical Microbiology*, **62** (4), 525-530.

Pitout, J. D. D. 2012 Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, **3** (9).

Puño-Sarmiento, J.; Gazal, L. E.; Medeiros, L. P.; Nishio, E. K.; Kobayashi, R. K. T.; Nakazato, G. 2014 Identification of Diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **11** (9), 8924–8939.

Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Fakhr, M.K., Nolan, L.K. 2005 Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, **151** (Pt 6), 2097-2110. doi: 10.1099/mic.0.27499-0.

Russo, T. A.; Johnson, J. R. 2003 Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, **5** (5), 449-456.

Santos, A. C. M.; Zidko, A. C. M.; Pignatari, A. C. C.; Gales, A. C.; Silva, R. M. A. 2009 Virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. *O Mundo da Saúde*, **33** (4), 392-400.

Schouler, C.; Schaeffer, B.; Brée, A.; Mora, A.; Dahbi, G.; Biet, F.; Oswald, E.; Mainil, J.; Blanco, J.; Moulin-Schouleur, M. 2012 Diagnostic strategy for identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*, **50** (5), 1673-1678.

Schuroff, P. A.; Burgos, T. N.; Lima, N. R.; Lopes, A. M.; Pelayo, J. S. 2014 Phenotypic and genotypic characterization of potentially pathogenic *Escherichia coli* from water treatment plants. *Arquivos de Ciências da Saúde*, **21** (3), 93–98.

Schwartz, D. J., Kalas, V., Pinkner, J. S., Chen, S. L., Spaulding, C. N., Dodson, K. W., Hultgren, S. J. 2013 Positively selected FimH residues enhance virulence during

urinary tract infection by altering FimH conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110** (39), 15530-15537. doi:10.1073/pnas.1315203110.

Skyberg, Jerod A.; Johnson, T. J.; Johnson, J. R.; Clabots, C.; Logue, C. M.; Nolan, L. K. 2006 Acquisition of Avian Pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity*, **74** (11), 6287-6292.

Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B.; Denamu, E. 2010 The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, **8** (3), 207-217.

Wakimoto, N.; Nishi, J.; Sheikh, J.; Nataro, J. P.; Sarantuya, J.; Iwashita, M.; Manago, K.; Tokuda, K.; Yoshinaga, M.; Kawano, Y. 2004 Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for Enteroaggregative *Escherichia coli*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **71** (5), 687-690.

Wani, S. A.; Hussain, I.; Rather, M. A.; Kabli, Z. A.; Nagamani, K.; Nishikawa, Y.; Qureshi, S. D.; Khan, I. 2012 Putative virulence genes and biofilm production among typical Enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic children in Kashmir and Andhra Pradesh. *Indian Journal of Microbiology*, **52** (4), 587-592.

Wingender, J.; Flemming, H. C. 2011 Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **214** (6), 417-423.

Yamamoto, S.; Terai, A.; Yuri, K.; Kurazono, H.; Takeda, Y.; Yoshida, O. 1995 Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **12** (2), 85-90.

5 CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados a presença de ExPEC na água de consumo humano, pode ser um potencial problema de saúde para a população. Assim, mais trabalhos para investigar a ocorrência de ExPEC, em águas de consumo humano, são necessários, para compreender melhor as implicações que esse reservatório pode trazer para a saúde pública e por meio desses resultados, melhorar a qualidade microbiológica da água. Enfatizamos ainda, a necessidade de mudanças nas políticas e no comportamento da população que utiliza essas fontes de água. Além disso, o conhecimento sobre a presença desses patógenos deve servir para alertar as agências reguladoras, autoridades de saúde e educadores, sobre possíveis fatores para intervenções apropriadas e reavaliação das estratégias atuais de prevenção de doenças e contaminação.