



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ROGÉRIO ARCURI CONCEIÇÃO

“FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ASSOCIADA A SEPSE (SEPEC): CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E FILOGENIA”

Este exemplar, em resposta à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Rogério Arcuri Conceição e aprovada pela Comissão Organizadora

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C744f Conceição, Rogério Arcuri
Formação de biofilme em amostras de *Escherichia coli*
associada a sepse (SEPEC): caracterização fenotípica,
genotípica e filogenia / Rogério Arcuri Conceição. –
Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Tomomasa Yano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Biofilme. 2. Filogenia. 3. *Escherichia coli*. 4.
Sepse. I. Yano, Tomomasa, 1941-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Biofilm formation by sepsis associated *Escherichia coli* (SEPEC) strains: genotypic, phenotypic characterization and phylogeny.

Palavras-chave em inglês: Biofilm; Phylogeny; *Escherichia coli*; Sepsis.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Tomomasa Yano, Luciano Moura Martins, Carlos Emilio Levy.

Data da defesa: 24/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

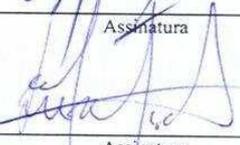
Campinas, 24 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

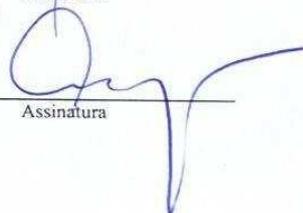
Prof. Dr. Tomomasa Yano (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Luciano Moura Martins


Assinatura

Prof. Dr. Carlos Emilio Levy


Assinatura

Dr(a). Gleize Vilella

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

*“...A natureza já estabeleceu as regras. Nós estamos aqui para entendê-las e explorar seus segredos”
Michael Roukes – Scientific American, 2008.*

*Dedico este trabalho à meu
filho Matheus Garcia
Conceição*

AGRADECIMENTOS

Neste trabalho, gostaria de agradecer à todos que de uma forma ou de outra me ajudaram, não só para a realização deste, mas sim, durante todo o percurso que percorri durante esta longa jornada.

Agradeço em primeiro lugar à Deus, por ter me dado saúde e me livrado de todos os males que passei.

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Tomomasa Yano pela confiança, companheirismo e cumplicidade.

Agradeço também aos amigos que fiz ao longo dessa jornada, Stella, Sandra, Luciano, Robert, Fernanda, Anneliza, Rebeca que sempre me auxiliaram em tudo que precisei.

Agradeço também à minha esposa, Ana Carolina Garcia Conceição pela paciência, compreensão e companheirismo.

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Biofilmes	18
1.1.1. Genes envolvidos na adesão inicial e formação de biofilme em <i>Escherichia coli</i>	20
1.1.2. Matriz extracelular e desenvolvimento tridimensional do biofilme.....	24
1.2. Filogenia de <i>Escherichia coli</i>	25
2. Objetivos Gerais	27
2.1. Objetivos Específicos	27
3. Material e Métodos	28
3.1. Amostras	28
3.2. Formação de biofilme <i>in vitro</i>	29
3.3. Testes em células Vero (Rim de macaco verde africano) e Hec-1B (Adenocarcinoma Endometrial Humano)	30
3.3. Testes genotípicos	34
3.3.1. Preparação do DNA bacteriano	34
3.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	34
3.3.3. Eletroforese em gel de agarose.....	37
4. Resultados	38
5. Discussão	50
6. Conclusões	55
7. Referências Bibliográficas	56

INDÍCE DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 - Linhagens utilizadas como controles positivos para a PCR.....	28
Tabela 2 - Linhagens utilizadas como controles positivos para os testes: Adesão e Invasão.	29
Tabela 3 - Iniciadores utilizados no estudo (descrição, seqüência, temperatura de anelamento, tamanho do produto amplificado e referência de cada iniciador).	36
Tabela 4 – Formação de biofilme, motilidade e associação de genes envolvidos na formação de biofilme em <i>E. coli</i> encontrados em SEPEC.	38
Tabela 5 – Relações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas envolvidas na adesão, invasão e formação de biofilme em SEPEC.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 – Etapas envolvidas na formação do biofilme bacteriano. No estágio inicial, através de adesinas a bactéria interage e adere-se ao substrato ou interface e uma vez que se tenha células agregadas o suficiente, inicia-se então a produção de exopolissacarídeos (EPS) envolvendo então a comunidade bacteriana no desenvolvimento do biofilme. Logo segue-se a maturação do biofilme, onde ele toma forma e segue-se o processo de dispersão, onde bactérias se desprendem e tem a chance de formar novos biofilmes em outros locais. Retirado de: (Kau, Hunstad e Hultgren, 2005, modificado pelo autor..... 19
- Figura 2 - Frequência na formação de biofilme entre as amostras de *Escherichia coli* associada a sepsse (SEPEC)..... 38
- Figura 3– Frequências entre as relações fenotípicas: adesão, invasão e formação de biofilme em SEPEC. Nota-se que 100% das amostras SEPEC foram capazes de aderir e invadir células Vero e Hec-1B e dentre as mesmas pudemos observar que 75,5% (37 amostras) foram capazes de formar biofilme em superfície inerte..... 42
- Figura 4 - Adesão de SEPEC em células endoteliais (Hec-1B) na presença e ausência de D-manose. A= Adesão do tipo difusa, na ausência de D-manose. B= Adesão do tipo difusa na presença de D-manose. Coloração: Giensa – May-Grunround. Aumento: 1000x. 45
- Figura 5 – Eletromicrografia de varredura da adesão de SEPEC com 3 horas de infecção em células Hec-1B. A= Ponto da adesão bacteriana a superfície celular. B= Maiores detalhes da adesão bacteriana mostrando o pedestal formado devido ao processo de adesão. C= Bactérias ao redor da célula e a presença de uma grande vesícula (Seta) com, possivelmente material endocitado próximo a zona de adesão bactéria (*) e formações de mielina (<), um processo de sinalização de morte celular e núcleo disforme. Aumento: A= 26.500; B=97000x; A= C=6500x..... 46
- Figura 6 – Citotoxicidade celular e sinalização de morte celular em células Hec-1B após 3 horas de infecção por SEPEC. A= Célula normal mostrando inúmeras mitocôndrias (setas) e processos de endocitose (>). B= Muitas mitocôndrias destruídas (setas), demonstrando

x

sinalização de morte celular. C= Bainha de mielina, um outro sinal de morte celular. D- Mitocôndrias disformes mostrando falta de algumas cristas (seta). Aumentos: A= 18500x; B= 46000x; C= 37000x; D=18500x..... 47

Figura 7 – Eletromicrografia de varredura da Adesão de SEPEC com 3 horas de infecção em células Vero. A= Bactérias aderidas ao longo da superfície celular. B= Maiores detalhes de pontos de formação de microcolônias. C= Melhores detalhes da microcolônia. D= Maiores detalhes da rede de Exopolissacarídeos (EPS) envolvendo a micocolônia sob a superfície celular. Aumentos:..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS

- APEC: *Escherichia coli* Patogênica Aviária
- EAEC: *Escherichia coli* Enteroagregativa
- EPEC: *Escherichia coli* Enteropatogênica
- EPS: Exopolissacarídeos
- AE: *Attaching and Effacing*
- ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigênica
- ExPEC: *Escherichia coli* Patogênica Extra-intestinal
- FV: Fatores de Virulência
- HUS: Síndrome Urêmica Hemolítica
- IB: Instituto de Biologia
- MNEC: *Escherichia coli* associada à Meningite Neonatal
- PBS: Tampão Salina Fosfato
- PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
- SEPEC: *Escherichia coli* associada à Sepsis
- TSA: *Trypticase Soy Agar*
- TSB: *Tryptone Soya Broth*
- UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas
- UPEC: *Escherichia coli* Uropatogênica
- ITU: Infecções do Trato Urinário
- Stx: Toxina Shiga
- UTIs: Unidades de Tratamento Intensivo

RESUMO

Escherichia coli Patogênica Extra-intestinal (ExPEC) forma um grupo bacteriano heterogêneo quanto a fatores de virulência envolvidos em sua patogenicidade e locais de infecção no hospedeiro. Nosso trabalho teve como objetivo estudar as características fenotípicas e genotípicas da formação do biofilme e filogenia de amostras de *Escherichia coli* associada à sepse humana (SEPEC), assim como seus padrões de adesão e invasão às células renais (Vero) e endoteliais (Hec-1B). SEPEC mostrou alta prevalência na capacidade de formar biofilme (82,2%) “in vitro”, em superfícies de plásticos, sugerindo envolvimento das fimbria tipo 1 (*fimH*), antígeno 43 (*ag43*) e antígenos de curli (*csgA*). No estudo filogenético, 26 (53,2%) amostras de SEPEC foram classificadas como pertencentes ao grupo D, 19 (38,8%) ao grupo B2, 2 ao grupo A (4,0%) e 2, classificadas como pertencentes ao grupo B1 (4,0%). Outras adesinas, invasinas e toxinas como *mat* (adesina regulada pela temperatura e associada à meningite), *iha* (Adesina regulado por ferro), *neuC* (polissacarídeo capsular K1), *gimB* (ilha de patogenicidade associada à meningite neonatal), *ibeA* (relacionada à invasão do endotélio cerebral) e *tia* (locus de invasão toxigênico em *E. coli* Enterotoxigênica), foram detectadas em frequências de 38,8%, 32,7%, 24,5%, 12,2%, 10,2%, 18,4%, 69,4% e 57,1%, respectivamente. No teste de adesão, 100% das amostras de SEPEC aderiam e invadiram tanto células Vero como Hec-1B. Através de microscopia eletrônica de transmissão, foram verificados pontos da adesão bacteriana em células Hec-1B, com formações de pedestais entre a membrana plasmática e as células bacterianas. A microscopia eletrônica de varredura, em células Vero, demonstrou pontos da adesão de SEPEC sobre a superfície celular, com a formação de microcolônias envoltas por exopolissacarídeos (EPS).

Palavras chave: Biofilme, Filogenia, *Escherichia coli*, Sepses

Abstract

Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) form a heterogeneous group as the bacterial virulence factors involved in its pathogenicity and local infection in the host. Our work aimed study the phenotypic and genotypic characteristics of biofilm formation and phylogeny of sepsis-associated *Escherichia coli* Human (SEPEC), as well as their patterns of invasion and adhesion to kidney (Vero) and endothelial (Hec-1B) cells. SEPEC showed high prevalence in the ability to form *in vitro* biofilm (82.2%) on plastic surfaces, suggesting involvement of type 1 fimbriae (*fimH*), antigen 43 (*ag43*) and curly fimbriae (*csgA*). In phylogenetic analysis, 26 (53.2%) SEPEC strains were classified as belonging to group D, 19 (38.8%) to group B2, 2 in group A (4.0%) and 2, classified as belonging to group B1 (4.0%). Others adhesins, toxins and invasins *mat* (adhesin temperature-regulated associated with meningitis), *iha* (iron-regulated adhesin), *neuC* (capsular polysaccharide K1), *gimB* (pathogenicity island associated with neonatal meningitis), *ibeA* (brain microvascular endothelial cells invasion) and *tia* (toxigenic invasion locus from Enterotoxigenic *E. coli*), were detected at frequencies of 38.8%, 32.7%, 24.5%, 12.2%, 10.2%, 18, 4%, 69.4% and 57.1%, respectively. In the adhesion test, 100% of SEPEC strains adhered and invaded both Vero cells and Hec-1B. Through transmission electron microscopy, were found parts of bacterial adhesion in Hec-1B cells, with the formation of pedestals between the cytoplasmic membrane and bacterial wall-cell. The scanning electron microscopy in Vero cells, showed the accession of points SEPEC on the cell surface, with the formation of microcolonies surrounded by exopolysaccharides (EPS).

Key words: Biofilm, Phylogeny, *Escherichia coli*, Sepsis

1. Introdução

Escherichia coli é uma bactéria da família Enterobacteriaceae, caracteriza-se por ser Gram-negativa, bacilar não formadoras de esporos, podem ser móveis ou não, são anaeróbios facultativos, oxidase negativos e fermentam açúcares gerando uma variedade de produtos finais (Russo e Johnson, 2000; Croxen e Finlay, 2009).

E. coli trata-se de um membro constituinte da microbiota normal intestinal de animais homeotérmicos (aves e mamíferos) é uma bactéria muito versátil quanto a fatores de virulência, podendo dessa maneira causar essencialmente dois tipos de infecções: intestinais (diarréias ou disenteria), e extra-intestinais (infecções do trato urinário, sepse e meningites).

Existem ao menos seis bem caracterizados patotipos de *E. coli* que podem causar infecções intestinais em humanos (Kaper et al., 2004), são eles: EPEC (*E. coli* Enteropatogênica) normalmente associadas com diarréia infantil em países em desenvolvimento e produzem uma característica histopatológica conhecida como “*attaching and effacing*” (AE) sobre as células do epitélio intestinal; EHEC (*E. coli* enteroemorrágica) que também causa histopatologia por AE, mas adicionalmente produz uma potente citotoxina - toxina Shiga (Stx) - que aumenta o espectro da doença incluindo diarréia, disenteria e a síndrome urêmica hemolítica (HUS), uma doença que acomete os rins e é potencialmente fatal. EHEC são um subgrupo de uma categoria maior chamada *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que produz Stx, mas podem não ter os genes que codificam a histopatologia AE. Vários outros sorotipos de *E. coli* mostraram-se produtoras de Stx, porém a maioria deles provavelmente não se torna potencialmente patogênico devido à ausência de outros fatores de virulência. ETEC (*E. coli* Enterotoxigênica) são a maior causa de

Diarréia dos Viajantes em indivíduos de países industrializados que viajam para países subdesenvolvidos e são uma importante causa de diarréia infantil. ETEC produz ST e/ou a enterotoxina termolábil (LT) assim como uma variedade de fatores de colonização intestinais. EIEC (*E. coli* Enteroinvasiva) são essencialmente *Shigella*, mais similares a *Shigella flexneri* ou *Shigella sonnei* uma vez que estas não produzem Stx como *Shigella dysenteriae*. *E. coli* e *Shigella* são taxonomicamente indistinguíveis ao nível de espécie e EIEC/*Shigella* causam diarréia e disenteria através de um mecanismo patogênico complexo que se inicia com a invasão epitelial e se espalha para as células adjacentes. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) foram inicialmente descobertas com base em seu padrão de aderência agregativa sobre cultura de células epiteliais, e desde então se descobriu que são produtoras de inúmeras toxinas. EAEC são progressivamente reconhecidas como a causa de diarréia persistente em crianças e adultos tanto em países em desenvolvimento quanto nos industrializados e foram causa de vários grandes surtos em diversos países. *E. coli* difusamente aderente (DAEC) forma um outro grupo, onde foram também inicialmente definidas com base em seu padrão de aderência difusa em cultura celular epitelial e foram implicadas como causa de diarréia em crianças mais velhas por estudos diversos. DAEC ativam a cascata de transdução de sinal celular epitelial que pode arruinar a função de enzimas, dentre outros danos (Kaper et al., 2004).

E. coli são também importante causa de infecções extra-intestinais. Um patotipo conhecido como *E. coli* uropatogênica (UPEC) é a maior causa de infecções do trato urinário (ITU). Múltiplas adesinas e toxinas foram descritas para UPEC e estes diferentes fatores de virulência (VF) são encontrados sob diferentes porcentagens entre os diferentes subgrupos de UPEC. Outro patotipo extra-intestinal, a *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC), é a mais comum causa de meningite por Gram-negativa em neonatos. NMEC desloca-se do sangue para o sistema

nervoso central através de um processo invasivo que resulta na inflamação das meninges (Kaper *et al.*, 2004).

Assim, Russo e Johnson (2000) propuseram que as amostras de *E. coli* associadas às infecções extra-intestinais, que causam principalmente infecções urinárias, meningites e sepse, fossem coletivamente denominadas como *Escherichia coli* Patogênica Extra-intestinal (ExPEC), envolvendo desta maneira: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a sepse (SEPEC), *E. coli* associada à meningite neonatal (NEMEC ou MNEC), etc. Os mesmos autores ainda ressaltam que análises moleculares sobre a epidemiologia de *E. coli* classificam ExPEC como sendo distintas das outras *E. coli* e assim ofereceram discernimento dentro da ecologia, evolução, reservatórios, vias de transmissão, interações parasito-hospedeiro, e mecanismos de virulência deste importante grupo de patógenos extra-intestinais.

E. coli é a bactéria Gram-negativo mais comumente isolada de infecções extra-intestinais, e, isolados do trato urinário, corrente circulatória, sistema nervoso central, trato respiratório e peritônio, normalmente demonstraram não só serem funcionalmente similares entre si quanto à virulência e filogenia, mas também totalmente distintos da *E. coli* patogênica intestinal e comensal (Russo e Johnson, 2000; Johnson *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001).

Sabe-se que a habilidade de bactérias em aderir e colonizar as superfícies de células epiteliais do hospedeiro é um passo essencial para o início de uma infecção (Johnson *et al.*, 2001), e em outras palavras é também um passo essencial na formação do biofilme. A capacidade de *E. coli* em aderir e colonizar superfícies inertes e/ou vivas, com conseqüente formação de biofilme, pode representar um importante papel na virulência e patogenia bacteriana, como estratégia de vida em ambientes hostis, tais como aqueles proporcionados pelo hospedeiro (defesa contra

fagócitos, anticorpos e antibióticos) como também aqueles ambientais, como em ambientes hospitalares (resistência a métodos de sanitização e esterilização) (Donlan e Costerton, 2002).

Sepse em humanos normalmente é secundário a infecções do trato urinário ou doenças respiratórias (Mokady, *et al.*, 2005). De acordo com David (1998) as infecções nosocomiais¹ mais comuns são infecções urinárias e pneumonias. De acordo com o autor em questão, isto se deve principalmente aos métodos invasivos, tais como a utilização de cateteres urinários e também a intubação traqueal.

Martínez e colaboradores (2006), estudando a formação de biofilme de isolados de *E. coli* de pacientes com bacteremias de um hospital na Espanha, concluíram ser comum bacteremias e infecções nosocomiais devido a utilização de cateteres, principalmente cateteres urinários.

Bacteremia representa uma condição na qual observa-se a presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea, podendo ou não representar um foco de infecção. A sepsé representa uma condição mais avançada da bacteremia, ou seja, uma forma grave de infecção, onde a bactéria foi capaz de sobreviver no sangue e então é capaz de atingir outros órgãos, uma condição na qual geralmente leva a morte. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2009) a sepsé representa uma das principais causas de morte no Brasil, principalmente em pacientes internados nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTI).

Tendo em vista a importância da formação de biofilmes na ecologia e fisiologia microbiana, o estudo de padrões genéticos, fenotípicos e filogenéticos envolvidos em sua formação, principalmente de membros constituintes da microbiota intestinal normal do homem é de grande relevância, uma vez que tais microrganismos por viverem concomitantemente com o homem, sempre representarão um grande problema de saúde pública.

¹ Infecções nosocomiais são infecções adquiridas em ambientes hospitalares com até 48 horas de internação.

Assim optamos por estudar os padrões de adesão, formação de biofilme e invasão de *E. coli* associada a sepses humana em células epiteliais e endoteliais, assim como também a pesquisa por genes de adesinas, invasinas e outros fatores de virulência descritos para ExPEC.

1.1. Biofilmes

Biofilmes na área médica devem ser definidos como comunidades complexas de bactérias aderidas a superfícies vivas, como por exemplo a placa bacteriana (Whittaker *et al.*, 1996). Tais formações, normalmente estão relacionados a infecções persistentes, como nos casos de infecções de cateteres e de implantes cirúrgicos, sendo uma causa comum de infecções hospitalares (Donlan e Costerton, 2002). Os biofilmes em ambientes proporcionados pelo hospedeiro já foram também relacionados a algumas doenças infecciosas e persistentes tais como: otite média crônica, fibrose cística e infecções do trato urinário (Costerton *et al.*, 1999 e Donlan e Costerton, 2002).

A complexidade na estrutura e no metabolismo do biofilme, permite uma analogia entre os biofilmes bacterianos e o tecido de organismos mais complexos, como eucariotos, permitindo dessa forma hipotetizar que os biofilmes bacterianos mimetizam em superfícies artificiais a adesão observada *in vivo* no epitélio dos hospedeiros infectados (Costerton *et al.*, 1999).

Diversas espécies bacterianas vêm sendo estudadas e tendo seus biofilmes bem caracterizados quanto as etapas de suas formações, além de estar elucidado e caracterizado os genes responsáveis pelo estabelecimento do mesmo, bem como o mecanismo responsável pela comunicação entre os indivíduos da comunidade (Donlan, 2002). Microrganismos como

Escherichia coli comensal (Pratt e Kolter, 1998), *Vibrio cholerae* El Tor (Watnick e Kolter, 1999), *Pseudomonas aeruginosa aeruginosa* (O'Toole e Kolter, 1998; Nagata *et al.*, 2004), *Staphylococcus aureus* (Cucarella *et al.*, 2001), *Staphylococcus epidermidis* (Vuong e Otto, 2002), *Burkholderia cepacia* (Speert, 2002), *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (Boddicker *et al.*, 2002), entre outros são alguns dos microrganismos dentre os quais a formação de biofilme tem sido detalhadamente estudada e descrita na literatura.

No geral, a formação de um biofilme bacteriano têm início com a adesão da bactéria ao substrato com conseqüente produção de exopolissacarídeos, maturação e dispersão de células planctônicas para novas áreas (Figura 1).

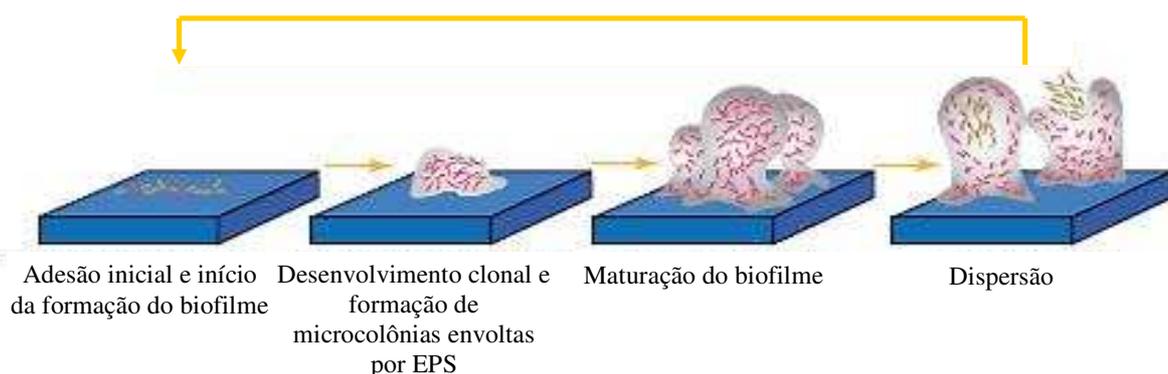


Figura 1 – Etapas envolvidas na formação do biofilme bacteriano. Retirado de: Kau *et al.*, 2005

No estágio inicial, através de flagelos e adesinas a bactéria interage e adere-se ao substrato ou interface, uma vez que se tenha células aderidas e agregadas o suficiente, inicia-se então a produção de exopolissacarídeos (EPS) envolvendo então a comunidade bacteriana no desenvolvimento do biofilme. Logo segue-se a maturação do biofilme, onde ele toma forma e segue-se o processo de dispersão, onde bactérias se desprendem e tem a chance de formar novos biofilmes em outros locais (Kau *et al.*, 2005).

A capacidade de formar biofilme não é exclusiva de microrganismos patogênicos, pois também é uma característica presente em espécies não patogênicas, como exemplo *E. coli* K-12, onde as fímbrias tipo 1 e os flagelos são responsáveis respectivamente pela adesão inicial e a motilidade, importantes para o estabelecimento do biofilme (Pratt e Kolter, 1998; Schembri *et al.*, 2003). Além destas estruturas também foi descrita a capacidade de agregação no biofilme bacteriano proporcionada pelo antígeno 43 (Ag43), uma proteína de membrana externa encontrada nesta espécie (Danese *et al.*, 2000) e fímbria curly (CsgA), uma organela de membrana, relacionada, dentre outras, a adesão e persistência da bactéria ao substrato.

1.1.1. Genes envolvidos na adesão inicial e formação de biofilme em *Escherichia coli*

Amostras de ExPEC possuem uma grande variedade de genes para adesinas que promovem a adesão da bactéria a receptores de células eucarióticas e também em componentes da matriz extracelular (Hacker, 1990). Essas adesinas são muito importantes na virulência da bactéria e em particular podem ser também um passo fundamental para o desenvolvimento da sepse. Além disso, adesinas representam um passo essencial no início da formação do biofilme.

Em *Escherichia coli*, segundo Schembri *et al.* (2003) os genes universalmente envolvidos no início da formação do biofilme são: *fimH* envolvidos na adesão inicial da bactéria ao substrato, *ag43* na agregação inter-bacteriana e *csgA* medeia a interação inter-bactéria e também bactéria-superfície.

1.1.1.1. Fímbria do tipo I (FimH)

A fímbria do tipo I (FimH) trata-se de uma fímbria muito bem distribuída dentro da família Enterobacteriaceae, tanto em membros patogênicos como em membros não-patogênicos. Em muitos casos, por exemplo em UPEC, FimH parece ser essencial na adesão bacteriana ao epitélio da bexiga e então estabelecimento da infecção, como no caso da cistite (Kau *et al.*, 2005). Além disso, ainda de acordo com esses autores, FimH também favorece na internalização bacteriana ao epitélio da bexiga, um fato que então pode levar a fase crônica da cistite.

A adesão bacteriana a célula eucariótica e conseqüente invasão celular mediada por FimH também já foi demonstrada por Teng *et al.*, 2005 em células endoteliais cerebrais. De acordo com os autores, FimH promove a adesão inicial de *E. coli* K1 um passo essencial para a translocação de *E. coli* pela barreira hematoencefálica no estabelecimento da doença em questão, no caso a meningite.

FimH na maioria das vezes está relacionada à adesão inicial de *E. coli* ao substrato, sendo ele inerte (Schembri, *et al.*, 2003) ou celular (Teng *et al.*, 2005), estando dessa forma diretamente relacionada à formação do biofilme.

FimH trata-se de uma proteína possuidora de um sítio de ligação a D-manose e assim se liga a esse carboidrato presente na membrana plasmática de células eucarióticas (Kau *et al.*, 2005). Além disso, Pouttu e colaboradores (1999) afirmam que mutações pontuais no gene *fimH* podem levar a substituições no peptídeo FimH, as quais poderiam aumentar a meningo-virulência de *E. coli*.

1.1.1.2. Antígeno 43 (Ag43)

Ag43 é uma proteína codificada pelo gene *flu*, caracteriza-se por ser uma proteína de membrana da família das auto-transportadoras e segundo Hasman *et al.* (1999) e Kjaergaard *et al.*, 2000 pode ser dita como auto-reconhedora, ou seja, Ag43 é capaz de reconhecer e se ligar a outra molécula de Ag43, formando um complexo Ag43-Ag43, a qual seria responsável pela autoagregação bacteriana em meios líquidos, e/ou em estágios iniciais da formação do biofilme. .

Kjaergaard *et al.* (2000) também observaram que Ag43 seria também responsável pela agregação tanto intra-espécies como também inter-espécies, o que poderia então se ter desenvolvimentos de biofilmes mistos entre diferentes espécies de bactérias.

Gabige *et al.* (2002) também relataram que Ag43 além de ser importante na agregação bacteriana, também seria um ponto de ligação de fagos, um fato no qual poderia favorecer eventos de recombinação genética, pelo processo conhecido por transdução.

Ulett *et al.* (2007), estudando mutantes isogênicos para o gene *flu* puderam observar que Ag43 também poderia ser associado ao aumento da uro-virulência de *E. coli* no ambiente da bexiga, aumentando assim a permanência de *E. coli* nesse ambiente.

Quando relacionados a outros fatores que favorecem a formação de biofilme, tais como: FimH, cápsulas, lipopolissacarídeos e flagelos, alguns estudos tem sugerido que a agregação bacteriana mediada por Ag43, ou seja, o contato célula-célula, poderia ser bloqueada fisicamente pela expressão dessas estruturas (Kjaergaard *et al.* (2000); Ulett *et al.*, 2007). No entanto, Kjaergaard *et al.* (2000), ressaltam que a expressão de Ag43 e FimH tratam-se de eventos independentes, e Ulett *et al.* (2007) afirmam que auto-agregação bacteriana mediada por Ag43 trata-se de um evento muito importante no aumento do biofilme. Além disso, Ulett *et al.* (2007)

concluíram que a expressão de grandes quantidades de Ag43 na superfície bacteriana e isso exerce um fenótipo dominante quando em baixos níveis da expressão de flagelos.

1.1.1.3. Fímbria curly (CsgA)

CsgA são fimbrias amilóides de membrana capazes de promover tanto ligação bactéria-bactéria (agregação) quanto ligação da bactéria-superfície. Além disso são fimbrias expressas por muitos isolados patogênicos de *E. coli* (Gophna *et al.*, 2001)

CsgA se ligam a algumas moléculas presentes em tecidos vivos, tais como: fibronectina (Olsen *et al.*, 1989), laminina (Olsen *et al.*, 1993), Plasminogênio (Sjobring *et al.*, 1994), proteínas de contato de fase (Bem Nasr *et al.*, 1996) e molécula de maior histocompatibilidade de classe I, ou MHC-I (Olsen *et al.*, 1998) e além disso mutantes defectivos para CsgA mostraram menor persistência em tecidos de aves (La Ragione *et al.*, 2000), como também menor colonização e invasão em células aviárias. De acordo com Gophna e colaboradores (2001) a adesão e invasão de células, mediada por CsgA, se deve principalmente a ligação de CsgA à fibronectina.

No entanto, CsgA também pode ser encontrada em amostras não-virulentas de laboratório, tais como *E. coli* K12. Gophna *et al.* (2001) estudando análises de seqüências entre o grupo de genes *csg* encontradas em ambas as amostras, virulenta e não virulenta, puderam verificar que essas seqüências eram idênticas. Sendo assim, esses autores propuseram que mesmo possuindo o mesmo grupo gênico as amostras não-virulentas não expressariam CsgA nas condições ambientais daquelas oferecidas pelo hospedeiro, tais como osmolaridade e temperatura..

Bian *et al.* (2000) observaram que *E. coli* K-12 e *Salmonella typhimurium* somente expressam CsgA em temperaturas inferiores à 37°C, não havendo expressão da mesma em temperatura corpórea (37°C), entretanto esses mesmos autores também observaram e relataram que amostras de *E. coli* associada a sepsis (SEPEC), expressavam curly à 37°C *in vitro*.

1.1.2. Matriz extracelular e desenvolvimento tridimensional do biofilme

Biofilmes por definição são populações de microrganismos fixos em um substrato envoltos por material polimérico extracelular ou exopolissacarídeos (EPS). Exopolissacarídeos e outras substâncias, tais como: proteínas (Sewart e Costerton, 2001), DNA (Whitchurch *et al.* 2002) e detritos bacterianos (Webb *et al.*, 2003), formam a então chamada “Matriz extracelular”.

A distinção entre Polissacarídeos extracelulares (ou Exopolissacarídeos - EPS) é apenas operacional. Segundo Branda *et al.* (2005) quando a bactéria cresce em um meio de cultura líquido e então é centrifugada, EPS associada a bactéria é chamada de cápsula e EPS presente no sobrenadante é EPS. No entanto, ressaltam os autores, quando se considera no biofilme, esse discernimento não é simplesmente operacional, uma vez que muitos dos EPS produzidos no biofilme são insolúveis e não são facilmente separados da célula, complicando dessa forma sua determinação química.

Em *Salmonella typhimurium* e *E. coli* a celulose parece ser um componente crucial na constituição da matriz extracelular (Zogaj *et al.*, 2001). Prigent-Combaret *et al.* (1999) afirmaram que em *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, o alginato e o ácido colânico, respectivamente, tem sua síntese induzida pelo processo de adesão bacteriana ao substrato.

Danese *et al.*, 2000) estudando a produção de EPS no desenvolvimento do biofilme de de *E. coli* K12 puderam observar que o ácido colânico não é responsável pela ligação inicial da bactéria ao substrato e sim para o estabelecimento estrutural e/ou manutenção do complexo tridimensional do biofilme.

1.2. Filogenia de *Escherichia coli*

Selander *et al.* (1987) caracterizando amostras de *E. coli* de diferentes fontes, através de fermentação de alguns açúcares, motilidade em ágar, atividade da enzima ornitina descarboxilase e padrão de migração eletroforética de 35 enzimas de *E. coli* definiram quatro grandes grupos filogenéticos (A, BI, B2, D). De acordo com os autores, *E. coli* poderia ser agrupada dentro de grupos compreendendo grupos comensais e alguns patógenos oportunistas (grupo A e BI) e grupos de *E. coli* Patogênica Extra-intestinal (grupos B2 e D). Alguns anos depois, Boyd e Hartl (1998) correlacionando quatro fatores de virulência: hemolisina, cápsula e fimbrias P e S de ExPEC com os respectivos grupos filogenéticos, puderam correlacionar que essas propriedades da virulência eram distribuídas predominantemente em dois grupos B2 e D, com eventuais ocorrências em A e BI, reforçando desta maneira a distinção filogenética de *E. coli* dentro de grupos patogênicos intestinais e extra-intestinais.

De acordo com alguns autores, tais como Boyd e Hartl (1998) e Bonacorsi *et al.* (2000). O maior número de fatores de virulencia de ExPEC está associado ao grupo B2 seguido pelo grupo D, e poucos têm sido associados aos grupos A e BI.

Bonacorsi *et al.* (2000) realizaram um extenso estudo que buscava marcadores genéticos para os quatro grupos filogenéticos, e encontraram três regiões específicas para *E. coli* causadora de meningite neonatal. Clermont *et al.* (2000), usando dois dos marcadores encontrados por Bonacorsi *et al.* (2000) e um fragmento anônimo de DNA encontrado no seqüenciamento do genoma da *E. coli* K-12 (Blattner *et al.*, 1997), desenvolveram uma técnica de determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* baseada na amplificação por PCR destas três seqüências. Estas três seqüências são: *chuA*, um gene necessário para o transporte do grupo heme da hemoglobina em *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, *yjaA*, um gene inicialmente identificado no seqüenciamento da *E. coli* K-12 cuja função é desconhecida, e um fragmento anônimo de DNA designado por TspE4.C2. Com o resultado das reações de amplificação foi possível se estabelecer de forma rápida e prática os 4 grandes grupos filogenéticos de *E. coli*.

2. Objetivos Gerais

Caracterizar fenotípica e genotipicamente as propriedades de formar biofilme “in vitro”, adesão e invasão às células reais e endoteliais, detectar de genes de toxinas e filogenia de amostras de *Escherichia coli* isoladas de sepse humana.

2.1. Objetivos Específicos

- 1) Detecção fenotípica da formação de biofilme em superfície inerte;
- 2) Caracterização fenotípica da adesão bacteriana à superfície celular;
- 3) Detecção fenotípica da invasão bacteriana;
- 4) Pesquisa de genes envolvidos na formação de biofilme (Fimbria tipo 1, Antígeno 43, e Fímbria Curli), genes de filogenia (*chuA*, *yjaA* e *tspE4C2*), invasinas (*gimB*, *ibeA* e *tia*) e toxinas (*vat* e *clyA*).

3. Material e Métodos

3.1. Amostras

Quarenta e nove (49) amostras de *Escherichia coli* provenientes de humanos, clinicamente diagnosticados com sepse pelo Hospital de Clínicas da Unicamp, foram isoladas por hemocultura entre 1998 e 2001 pelo Laboratório de Patologia Clínica (Sessão de Microbiologia Clínica) – HC – Unicamp (Ananias e Yano, 2008).

As amostras utilizadas como controles nesse estudo encontram-se na tabela abaixo. Todas as amostras aqui descritas, encontram-se devidamente estocadas no Laboratório de Fatores de Virulência em Bactérias – Departamento de Microbiologia e Imunologia, Unicamp.

Tabela 1 – Linhagens de *E. coli* utilizadas como controles positivos para a PCR.

Linhagens	Padrões de genes (iniciadores)
K12.C600	<i>fimH, flu, csgA, srl, clyA, yjaA</i>
AC53	<i>vat, ibeA</i>
J96	<i>neuC, mat, iha, gimB, tia</i>
O157:H7	<i>chuA</i>
ATCC 25922	TspE4.C2

Tabela 2 - Linhagens de *E. coli* utilizadas como controles positivos para os testes: Adesão e Invasão.

Linhagens	Descrição dos padrões de adesão
K12.C600	Adesão negativa (na presença de manose)
17-2	Adesão agregativa
E2348/69	Adesão localizada
O8 TR 302/4	Adesão Difusa
O124:H-	Invasão positivo

3.2. Formação de biofilme *in vitro*

Para avaliar e quantificar a formação de biofilme utilizou-se a metodologia proposta por Wakimoto *et al.* (2004) com algumas modificações. Foram inoculados 5 μ L da do crescimento bacteriano, obtido em caldo TSB (*Tryptone Soya Broth*) a 37° C por 18h sob agitação, em microplaca de poliestireno de 96 poços contendo 200 μ L de meio Eagle suplementado com 0,45% de glicose. As amostras foram incubadas por 18h a 37° C e, após este período, o meio foi descartado e acrescentado 200 μ L de cristal violeta a 0,5 % por cinco minutos, seguido de lavagem com água destilada e acréscimo de 200 μ L de etanol 95% em cada poço. Foi realizada leitura a 570nm (OD₅₇₀) em leitor de ELISA. O teste foi considerado positivo quando OD₅₇₀ \geq 0,1 pela medida da absorbância comparada com o branco. A amostra de *E. coli* enteroagregativa O42 foi utilizada como controle positivo.

3.3. Testes em células Vero (Rim de macaco verde africano) e Hec-1B

(Adenocarcinoma Endometrial Humano)

Para a realização dos testes de adesão e invasão foram utilizados inóculos bacterianos padronizados de acordo com o tubo 1 da escala de MacFarland (ou 3×10^8 bactérias/mL).

3.3.1. Preparo das células Vero e Hec-1B

Utilizaram-se para o cultivo celular o meio Eagle para célula Vero e meio RPMI para a célula Hec-1B, sobre lamínulas, em placas de 24 poços com atmosfera de CO₂ contendo 1 mL de meio, acrescidos de 10% de soro fetal bovino (SFB).

3.3.1.1. Teste de adesão

As amostras de *E. coli* foram semeadas em meio TSB e incubadas por 18 horas a 37°C sob agitação. Após este tempo, uma alíquota de 1mL do crescimento foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm. Após este processo o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi suspenso em 1mL de PBS (Tampão Salina Fosfatada) estéril. Para se eliminar possíveis toxinas produzidas pela bactéria, este processo foi repetido 3 vezes.

A metodologia utilizada para o teste de adesão foi a proposta por Scaletsky *et al.* (1984) com algumas modificações. As células foram cultivadas em placas de 24 poços em atmosfera de CO₂, contendo 1 mL de meio acrescido de 10% de soro fetal bovino (Eagle para a linhagem

celular Vero e o meio RPMI para a linhagem Hec-1B). Após a formação da monocamada celular, as lamínulas foram lavadas três vezes em PBS estéril e em cada câmara foram adicionados 900µL de meio acrescido de 2% de soro fetal bovino e 100µL do preparado bacteriano.

Todo o processo supra mencionado foi realizado para a caracterização da adesão celular sob microscopia ótica e também foi utilizado para microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Para se observar a influência da fimbria do tipo I na adesão bacteriana também se realizou o teste de adesão celular utilizando-se 1% de D-manose. Ainda para microscopia ótica as lamínulas foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas com May-Grünwald (5 minutos) e Giensa (20 minutos) e observadas ao microscópio ótico com objetiva de imersão. Os testes foram realizados em duplicata.

As linhagens padrão para cada tipo de adesão podem ser observadas na tabela 2.

3.3.1.2 Teste de invasão

Inicialmente as amostras de SEPEC foram analisadas quanto a nível de resistência a gentamicina, através da técnica de difusão em disco, segundo *National Committee on Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2006).

O teste de invasão das amostras de SEPEC foi realizado como uma extensão do teste de adesão. Após 3 horas de infecção e a lavagem da monocamada celular com PBS, acrescentou-se a cada orifício 1,0 mL do respectivo meio utilizado para cada cultivo celular acrescido de 2% de SFB e 100µg/mL de gentamicina para inviabilizar qualquer bactéria extracelular. A microplaca foi incubada por 2 horas a 37°C e, após este período, lavada com 1 mL de PBS 10 vezes por orifício.

A avaliação da invasão celular foi obtido através da determinação do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC\mL⁻¹) em placas de Agar MacConkey. Nesta avaliação, após a lavagem dos poços, as células foram lisadas pela adição de 500µL de Triton X-100 a 0,1% gelado por câmara. Na seqüência o lisado celular (500µL) foi centrifugado a 10.000 RPM por 10 minutos sendo o precipitado suspenso em 100 µL de caldo TSB. Feito isso realizou-se a diluição seriada de tal inóculo a proporções adequadas para a contagem de UFCs em placa (10⁻³).

A metodologia utilizada para o teste de adesão foi a proposta por Scotland e Rowe (1981).

Após incubação das placas por 18 horas a 37°C, determinou-se o número de UFC's.

3.3.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura foram escolhidas as amostras positivas na formação de adesão em célula e biofilme. O preparo celular, infecção e adesão celular foi realizado da mesma maneira pela qual foi realizada o teste de adesão (ver item material e métodos, item 3.2.1.2). Após o procedimento de adesão as lamínulas de tais amostras foram então preparadas para microscopia eletrônica de transmissão e varredura. A fixação da monocamada celular foi realizada com Glutaraldeído 2,5% (v/v) em 0,1M de tampão Cacodilato durante 4 horas a temperatura ambiente (Kitajima *et al.*, 1999). Em seguida foram lavadas com solução de lavagem glicosada e, pós-fixados durante 2 horas com Tetróxido de Ósmio (O₂O₄) 1% (v/v) e novamente lavadas em solução glicosada. Posteriormente foram desidratadas em gradiente crescente de concentração de Etanol (70% - 100%) e em seguida levados ao Ponto Crítico com CO₂. As amostras de tecido foram montadas imediatamente em suportes para Microscopia de varredura e após secarem, cobertos com uma camada de ouro em evaporador

Balzers (200 seg, 40 mA), para facilitar a observação em microscópio de varredura (JOEL MS 6300), Laboratório de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná.

3.3.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise em microscopia eletrônica de transmissão foram escolhidas as amostras positivas no teste de adesão e invasão. O preparo celular, infecção e invasão celular foi realizado da mesma maneira pela qual foi realizada o teste de adesão (ver material e métodos, item 3.2.4.2) e invasão (ver material e métodos, item 3.2.1.2).

As lamínulas contendo a monocamada celular foram fixadas por 30 minutos em solução fixadora (2% paraformaldeído (Sigma, St Louis, USA) e 2% de glutaraldeído (Electron Microscope Science, USA) em 10 mM tampão cacodilato, pH 7.4). As lamínulas foram desidratadas através de um gradiente em etanol e subsequentemente imersos em propileno óxido/Epon 812 (Electron Microscope Science) (media de 1:1 e 3:1, respectivamente) por 6 horas antes da administração da resina pura (*overnight*). Após este processo se deixará a resina para polimerização por 72 horas à 60°. As seções ultra finas foram coradas duas vezes com 2% de acetato de uranila (Fluka, Switzerland) 0.5% de *lead citrate* (Fluka, Switzerland) antes da observação e documentação com o microscópio eletrônico de transmissão (LEO-Schot Zeiss EM906) 80 kVa.

3.3. Testes genotípicos

3.3.1. Preparação do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizada conforme Blanco *et al.* (1997), com modificações. As amostras foram pré-cultivadas em meio TSB a 37°C por 24 horas e depois semeadas no meio de cultura TSA (*Trypticase Soy Agar*) e incubadas a 37°C por 24h para a obtenção de crescimento confluyente. Foi coletada uma alçada e esta suspensa em 300µl de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0). Esta suspensão bacteriana foi fervida a 100°C por 10 minutos para o rompimento da membrana bacteriana e a liberação do ácido nucléico e depois centrifugada a 12000 rpm por 3 minutos. O “pellet” foi descartado e o sobrenadante utilizado para a reação em cadeia de polimerase (PCR).

3.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para cada um dos genes já descritos na literatura (Tabela: 1). A PCR teve um volume total de 30µl e cada reação, 30-150ng (variando conforme o iniciador utilizado), 2,5µl de cada dNTP (Fermentas), Tampão 10X (10mM Tris-HCl com pH 8,3 e 50mM KCl), 50mM MgCl₂, Taq DNA polimerase 1U

(Fermentas), 7 μ l de DNA extraído e água deionizada estéril, quantidade suficiente para completar volume da reação.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados no estudo (descrição, seqüência, temperatura de anelamento, tamanho do produto amplificado e referência de cada iniciador).

Gene	Description	Sequencia (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	T.A. (°C)	Referência
<i>fimH</i> ¹	Adesina da fímbria tipo I	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	63,0	Johnson <i>et al.</i> , 2000
<i>flu</i> ¹	Proteína autotransportadora	GACTATGACCGGATTSTGGCAGGCT GTGGCTCCAGCATCAGRTTGCA	499	30,0	Yang <i>et al.</i> , 2004
<i>csgA</i> ¹	Fímbria curly (Estrutural)	GGCGGAAATGGTTCAGATGTTG CGTATTCATAAGCTTCTCCCGA	295	30,0	Bian <i>et al.</i> , 2000
<i>crl</i> ¹	Fímbria curly (Regulador)	TTTCGATTGTCTGGCTGTTG CTTCAGATTACAGCGTCGTC	250	54,0	Maurer <i>et al.</i> , 1998
<i>neuC</i> ²	Polissacarídeo capsular K1	GGTGGTACATTCCGGGATGTC AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	62,0	Watt <i>et al.</i> , 2003
<i>mat</i> ³	Fímbria regulada pela temperatura e associada a meningite	TATACGCTGGACTGAGTCGTG CAGGTAGCGTCGAACTGTA	899	62,0	Ewers <i>et al.</i> , 2007
<i>iha</i> ³	Adesina regulada por ferro	TAGTGCGTTGGGTTATCGCTC AAGCCAGAGTGGTTATTCGC	609	62,0	Ewers <i>et al.</i> , 2007
<i>gimB</i> ⁴	Ilha de Patogenicidade associada a meningite neonatal	TCCAGATTGAGCATATCCC CCTGTAACATGTTGGCTTCA	736	62,0	Ewers <i>et al.</i> , 2007
<i>ibeA</i> ⁴	Invasão do endotélio cerebral	TGGAACCCGCTCGTAATATAC CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	342	62,0	Ewers <i>et al.</i> , 2007
<i>tia</i> ⁴	Locus de invasão toxigênico em ETEC	AGCGCTTCCGTCAGGACT T ACCAGCATCCAGATAGCGAT	512	62,0	Ewers <i>et al.</i> , 2007
<i>clyA</i> ⁵	Citolisina A	GAGGCGAATGATTATGACTG ACTTCAGGTACCTCAAAGAG	920	48,6	Kerényi <i>et al.</i> , 2005
<i>vat</i>	Proteína autotransportadora vacuolizante	AACGGTTGGTGGCAACAATCC AGCCCTGTAGAATGGCGAGTA	420	59,8	Restieri <i>et al.</i> , 2007
<i>chuA</i> ⁶	Gene requerido para o heme-transporte	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	60,0	Clermont <i>et al.</i> , 2000
<i>yjaA</i> ⁶	Função desconhecida	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	60,0	Clermont <i>et al.</i> , 2000
<i>tspE4.C2</i> ⁶	Fragmento anônimo de DNA	GAGTAATGTCCGGGCATTCA CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	152	60,0	Clermont <i>et al.</i> , 2000

¹ Genes envolvidos na formação de biofilme em *E. coli*; ² Cápsula; ³ Outros genes de adesinas de ExPEC; ⁴

Genes de invasinas; ⁵ Genes de toxinas e ⁶ Genes de filogenia de *E. coli*.

3.3.3. Eletroforese em gel de agarose

Para a leitura do resultado das amplificações, 5 μ L do tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 25% de ficol) foi misturado ao produto da reação. Foram aplicados 10 μ L da mistura no poço preparado em gel de agarose 2% (Amersham Pharmacia Biotech/Suécia), em tampão Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M pH8 (T.A.E). A identificação da banda foi feita mediante incubação em solução de brometo de etídeo (1,5 μ g/mL) por 15 minutos e visualizada em transiluminador de luz UV.

Além disso, foi utilizado um padrão de peso molecular (“ladder”), capaz de marcar intervalos de 100 pb, possibilitando a conferência do produto de amplificação.

4. Resultados

A triagem das amostras formadoras de biofilme (Figura 2), mostrou que 81,7% das amostras estudadas foram capazes de formar biofilme em superfície inerte (microplaca de poliestireno).

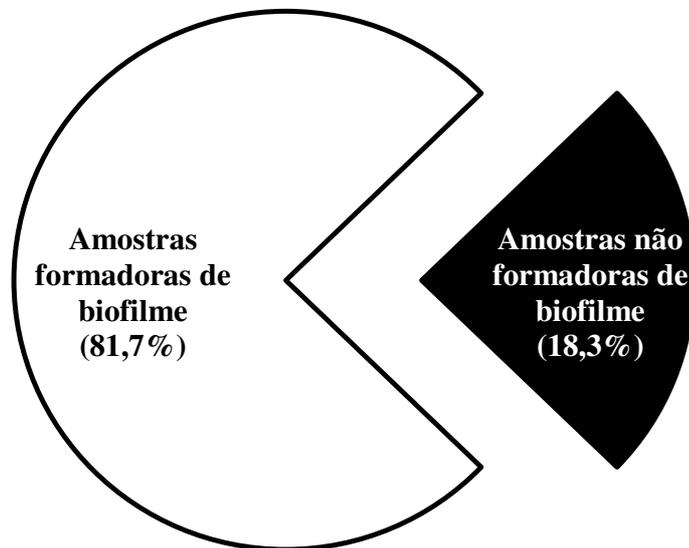


Figura 2 - Frequência na formação de biofilme entre as amostras de *Escherichia coli* associada à sepse (SEPEC).

Todas as amostras de SEPEC foram positivas para o teste de motilidade (Tabela 3). Sendo assim, a formação de biofilme em microplaca de poliestireno e motilidade tiveram uma congruência de 100%, ou seja, todas as amostras formadoras de biofilme eram também móveis.

Tabela 4 – Características fenotípicas e genótípicas das amostras de *Escherichia coli* associada a sepse

Amostras	Grupo filogenético	Formação de biofilme	Motilidade	Adesinas envolvidas na formação do biofilme				Outras adesinas		Adesão e Invasão	Polissacarídeo capsular K1	Invasinas			Toxinas	
				<i>fimH</i>	<i>Ag43</i>	<i>csgA</i>	<i>crl</i>	<i>mat</i>	<i>iha</i>	Vero e Hec-1B	<i>neuC</i>	<i>gimB</i>	<i>ibeA</i>	<i>tia</i>	<i>clyA</i>	<i>vat</i>
3	D	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
4	D	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
5	D	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
8	B1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
10	B2	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
13	D	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
14	B2	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
16	D	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
17	B2	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
18	B2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
19	D	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
20	D	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
21	D	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
22	B2	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
23	D	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
24	D	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
25	B2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
26	A	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
27	D	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
28	D	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
29	D	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
31	D	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
33	B2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
34	B2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
36	D	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
37	D	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
38	B2	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
39	B1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-

Continuação da tabela 4 – Características fenotípicas e genotípicas das amostras de *Escherichia coli* associada a sepsse.

Amostras	Grupo filogenético	Formação de biofilme	Motilidade	Adesinas envolvidas na formação do biofilme				Outras adesinas		Adesão e Invasão	Polissacarídeo capsular K1	Invasinas			Toxinas	
				<i>fimH</i>	<i>ag43</i>	<i>csgA</i>	<i>crl</i>	<i>mat</i>	<i>iha</i>	Vero e Hec-1B	<i>neuC</i>	<i>gimB</i>	<i>ibeA</i>	<i>tia</i>	<i>clyA</i>	<i>vat</i>
40	B2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	
41	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
42	A	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	
43	D	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	
44	B2	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
46	B2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
47	B2	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
48	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
49	B2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
50	B2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	
51	B2	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
52	B2	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	
53	B2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	
54	D	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	
56	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
57	D	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	
58	D	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	
62	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
71	D	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	
74	B2	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	
76	D	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	

As frequências dos genes envolvidos na formação de biofilme em *E. coli*, encontrados para SEPEC, isoladamente, foram aproximadamente: 98,8% para *fimH* (48 amostras), 69,4% para *flu* (34 amostras) e 53,1% para *csgA* (26 amostras). Quando relacionados os genes envolvidos na formação de biofilme e as amostras efetivamente formadoras de biofilme, obtivemos as seguintes relações: 97,5% para *fimH* (39 amostras); 70,0% para *flu* (28 amostras) e 57,5% para *csgA* (23 amostras), ou seja, apenas 1 amostra (2,5%) formadora de biofilme não apresentou o gene *fimH*. Quando confrontados, encontramos que: 67,5% (27 amostras) apresentaram *fimH* e *flu*; 57,5% *fimH* e *csgA* e 45,0% (18 amostras) apresentaram os 3 genes concomitantemente. Além disso, quando confrontados *csgA* (fímbria curly) e *crl* (gene regulador curly), obtivemos uma relação de 95,7% (ou 22 amostras) entre a positividade para *csgA* e *crl* (Tabela 4).

Analizamos também as mesmas relações inter-gênicas dentre as amostras não formadoras de biofilme e encontramos que: 100,0% (9 amostras) foram positivas para *fimH*; 66,7% (6 amostras) positivas para *flu* e 33,3% (3 amostras) positivas para *csgA*. Desta maneira, podemos logo inferir que: 66,7% dessas amostras apresentaram *fimH* e *flu*; 33,3% *fimH* e *csgA*; 22,2% (2 amostras) apresentaram *fimH*, *flu* e *csgA* e não formaram biofilme. Dentre as amostras não formadoras de biofilme e portadora de *csgA* 100,0% (6 amostras) foram positivas para *csgA* e *crl* (Tabela 4).

As análises filogenéticas de SEPEC demonstraram que 92,0% (45 amostras) alocaram-se dentro de amostras de *E. coli* Patogênica Extra-intestinal (ExPEC) e 8,0% (4 amostras) como não-ExPEC. Dentre essas amostras, os grupos filogenéticos mais encontrados foram, em ordem crescente: grupo D (53,2% ou 26 amostras), B2 (38,8% ou 19 amostras), A (4,0% ou 2 amostras) e B1 (4,0% ou 2 amostras).

Quando analisados concomitantemente a adesão, invasão e formação de biofilme em SEPEC, observamos que todas as amostras (100%), foram capazes de aderir e invadir as linhagens celulares Vero e Hec-1B, e ainda dentre as mesmas, enquadram-se as amostras formadoras de biofilme (Figura 3). Sendo assim, podemos logo inferir que todas as amostras SEPEC capazes de formar biofilme (82,2%) também são capazes de invadir células.

Vale-se lembrar que mesmo na presença de D-manose, SEPEC foi capaz de aderir em ambas as linhagens celulares aqui analisadas.

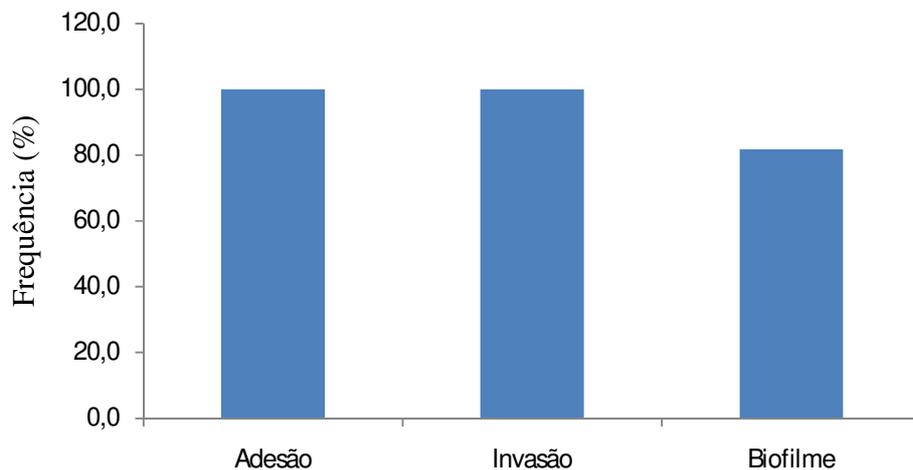


Figura 3– Frequências entre as relações fenotípicas: adesão, invasão e formação de biofilme em SEPEC. Nota-se que 100% das amostras SEPEC foram capazes de aderir e invadir células Vero e Hec-1B e dentre as mesmas pudemos observar que 81,7% (37 amostras) foram capazes de formar biofilme em superfície inerte.

Quando analisadas as frequências isoladas de cada gene em SEPEC, logo pode-se observar as maiores prevalências dos genes envolvidos na adesão e mais precisamente envolvidos na formação do biofilme foram: *fimH*, *flu*, *csgA* e *crl* (Tabelas 4 e 5).

Nota-se também uma prevalência significativa de genes para outras adesinas testadas, tais como: *mat* e *iha*, 38,8 e 32,7% respectivamente. Altas incidências também foram observadas para genes codificadores de toxinas, tais como *clyA* e *vat*, 69,4 e 57,1%, respectivamente. Outros genes, como *gimB*, *ibeA* e *tia*, ambas invasinas, podem também ser observadas, no entanto, em menores proporções: 12,2; 10,2 e 18,4% respectivamente. O antígeno capsular K-1, codificado pelo gene *neuC*, relacionado a *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC), foi amplificado em apenas 12 amostras ou 24,5%. Tais relações entre adesinas, invasinas, toxinas e antígeno capsular K1 dentro de cada grupo filogenético de ExPEC podem ser observados na tabela a seguir:

Tabela 5 – Relações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas envolvidas na adesão, invasão e formação de biofilme em SEPEC.

		ExPEC (N= 45)											
		Grupo D (N=26)						Grupo B2 (N=19)					
		Adesão (N=26)		Invasão (N=26)		Biofilme (N=18)		Adesão (N=19)		Invasão (N=19)		Biofilme (N=14)	
		%	(N)	(%)	(N)	(%)	(N)	(%)	(N)	(%)	(N)	(%)	(N)
Adesinas	<i>mat</i> (N=19)	42,3	11	3,8	1	34,6	9	31,6	6	26,3	5	26,3	5
	<i>iha</i> (N=16)	38,5	10	38,5	10	30,8	8	31,6	6	31,6	6	15,8	3
Invasinas	<i>gimB</i> (N=6)	7,7	2	3,8	1	3,8	1	21,1	4	21,1	4	10,5	2
	<i>ibeA</i> (N=5)	7,7	2	7,7	2	7,7	2	15,8	3	15,8	3	10,5	2
	<i>tia</i> (N=8)	11,5	3	7,7	2	7,7	2	26,3	5	26,3	5	26,3	5
Biofilme	<i>fimH</i> (N=48)	100,0	26	92,3	24	69,2	18	94,7	18	84,2	16	73,7	14
	<i>ag43</i> (N=34)	65,4	17	65,4	17	46,2	12	73,7	14	68,4	13	52,6	10
	<i>csgA</i> (N=26)	53,8	14	50,0	13	34,6	9	47,4	9	36,8	7	42,1	8
	<i>crl</i> (N=47)	100,0	26	96,2	25	69,2	18	89,5	17	78,9	15	68,4	13
Toxinas	<i>clyA</i> (N=34)	100,0	26	92,3	24	69,2	18	21,1	4	10,5	2	21,1	4
	<i>vat</i> (N=28)	38,5	10	38,5	10	26,9	7	84,2	16	78,9	15	68,4	13
Cápsula	<i>neuC</i> (N=12)	26,9	7	26,9	7	19,2	5	26,3	5	26,3	5	26,3	5

Na microscopia óptica foi observado que 100% das amostras de SEPEC, tanto na presença como ausência de D-manose, foram positivas para o teste de adesão. Dentre essas amostras, em sua grande maioria, 81,6% (40 amostras), mostraram adesão do tipo difusa, seguido por 18,4 (9 amostras) adesão do tipo localizada (Figuras 4 A e B, adesão do tipo difuso em células endoteliais).

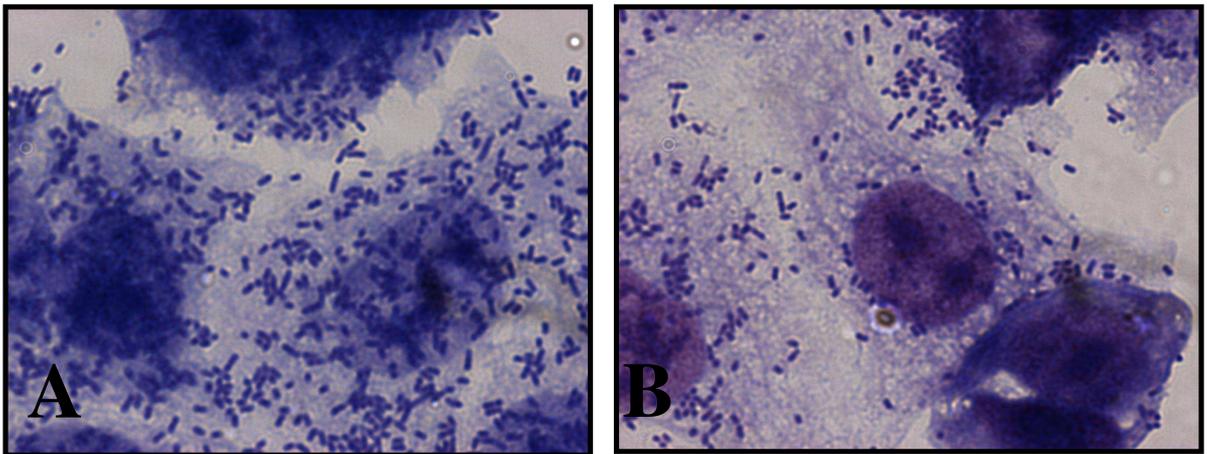


Figura 4 - Adesão de SEPEC em células endoteliais (Hec-1B) na presença e ausência de D-manose. A= Adesão do tipo difusa, na ausência de D-manose. B= Adesão do tipo difusa na presença de D-manose. Coloração: Giemsa – May-Grünwald. Aumentos: 1000x.

Quando analisados sob microscopia eletrônica de transmissão, notamos pontos de adesão bacteriana (Figura 5 A e B) com formações de pedestais entre a membrana citoplasmática da célula eucariótica e a parede celular da bactéria.

Em alguns pontos do tapete celular, notaram-se também a presença de vacúolos próximos aos pontos de adesão bacteriana, sugerindo uma possível invasão bacteriana através da membrana citoplasmática (Figura 5 C).

Diferentes campos foram analisados e pôde-se notar a presença de diversos pontos onde se tornam-se nítidos alguns processos citotóxicos e de morte celular, possivelmente provocados por injúrias causadas pela bactéria propriamente dita ou ainda por toxinas por elas produzidas (Figura 6 A, B, C e D).

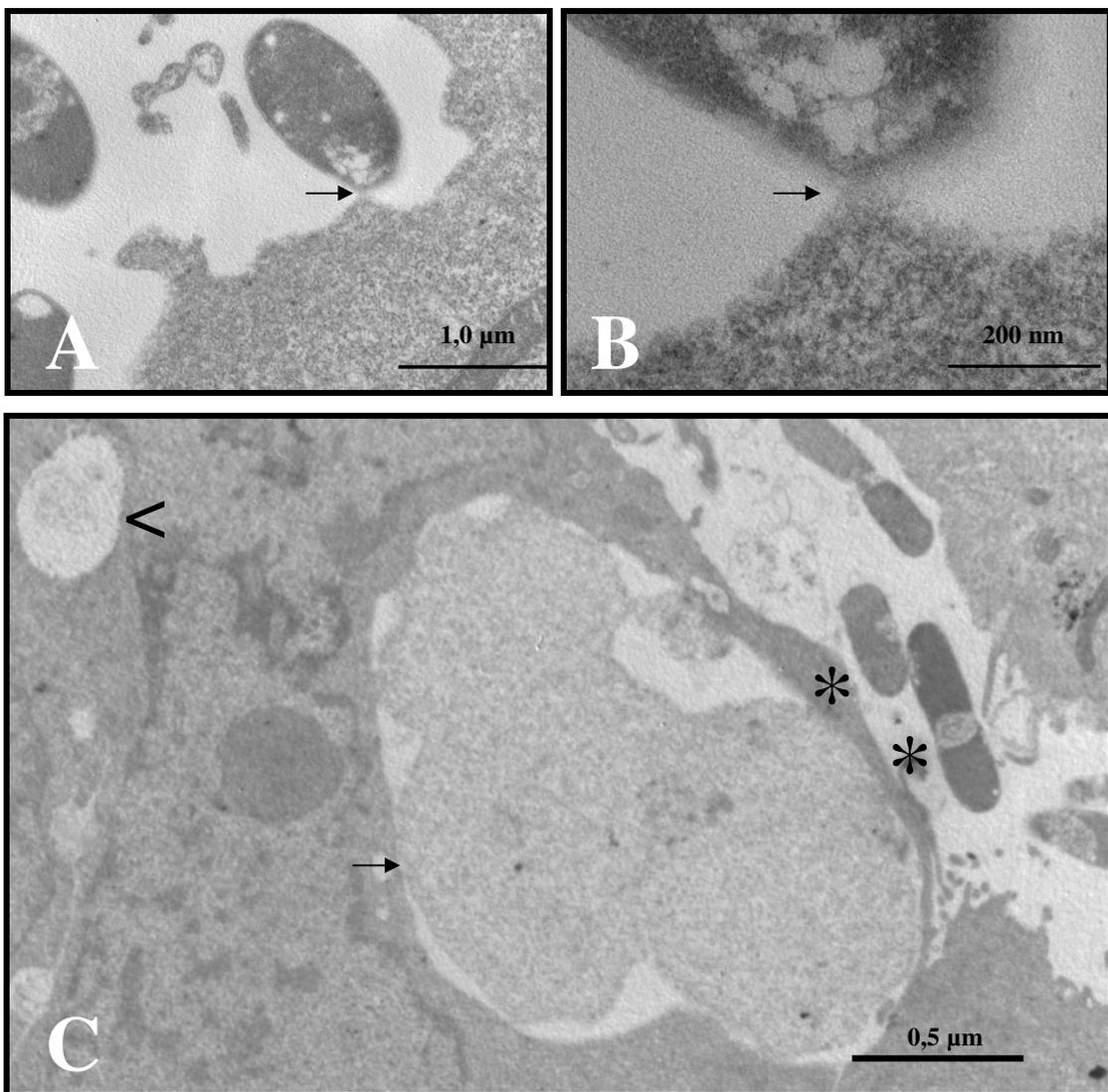


Figura 5 – Eletromicrografia de transmissão da adesão de SEPEC com 3 horas de infecção em células Hec-1B. A= Ponto da adesão bacteriana a superfície celular. B= Maiores detalhes da

adesão bacteriana mostrando o pedestal formado devido ao processo de adesão. C= Bactérias ao redor da célula e a presença de uma grande vesícula (Seta) com, possivelmente material endocitado próximo à zona de adesão bacteriana (*) e formações de mielina (<), um processo de sinalização de morte celular e núcleo disforme. Aumentos: A= 26.500; B=97000x; A= C=6500x.

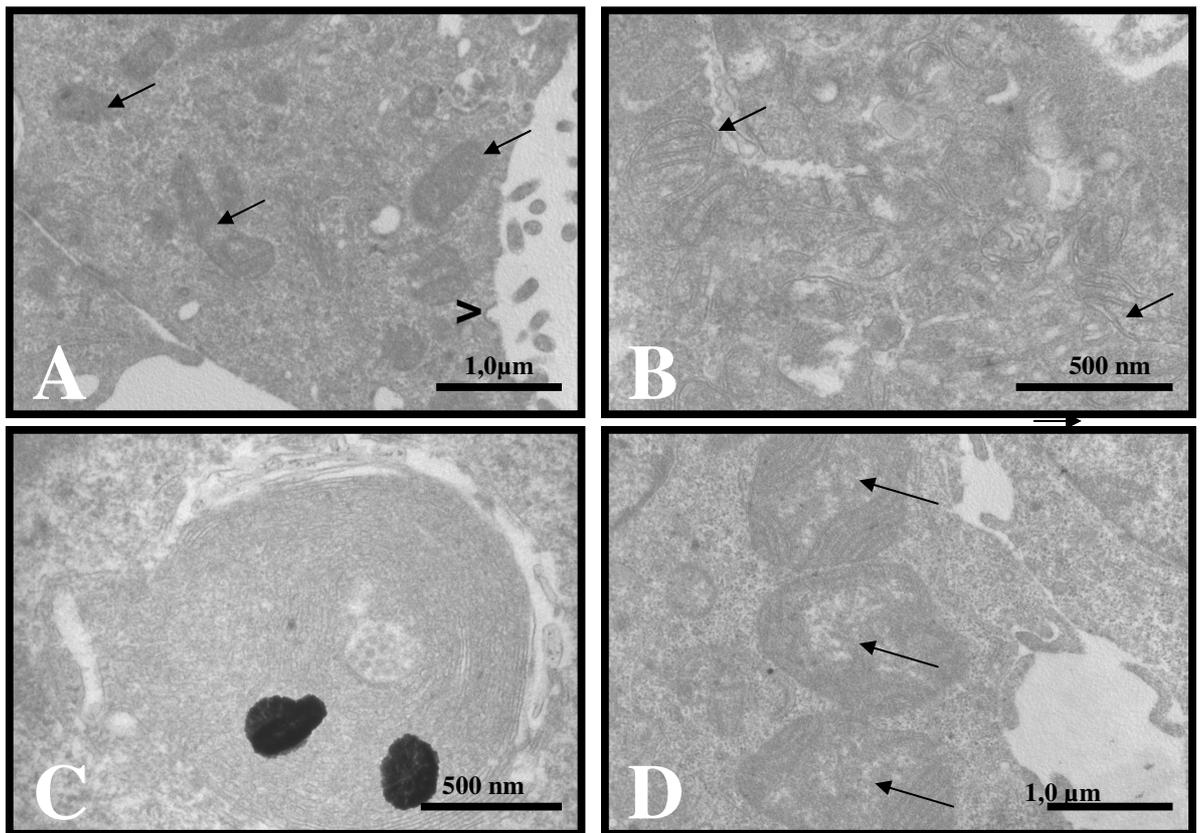


Figura 6 – Citotoxicidade celular e sinalização de morte celular em células Hec-1B após 3 horas de infecção por SEPEC. A= Célula normal mostrando inúmeras mitocôndrias (setas) e processos de endocitose (>). B= Muitas mitocôndrias destruídas (setas), demonstrando sinalização de morte celular. C= Bainha de mielina, um outro sinal de morte celular. D- Mitocôndrias disformes mostrando falta de algumas cristas (seta). Aumentos: A= 18500x; B= 46000x; C= 37000x; D=18500x.

Na microscopia eletrônica de varredura observamos formações de microcolônias bacterianas envoltas por exopolissacarídeos (EPS) na superfície celular, sugerindo um possível início de formação de biofilme sob tais células (Figura 7 A, B, C e D, ver também 8 A e B). Vale-se lembrar que tal teste realizou-se com apenas 3 horas de infecção e desta forma o que observamos nessas imagens trata-se apenas da adesão bacteriana à superfície celular.

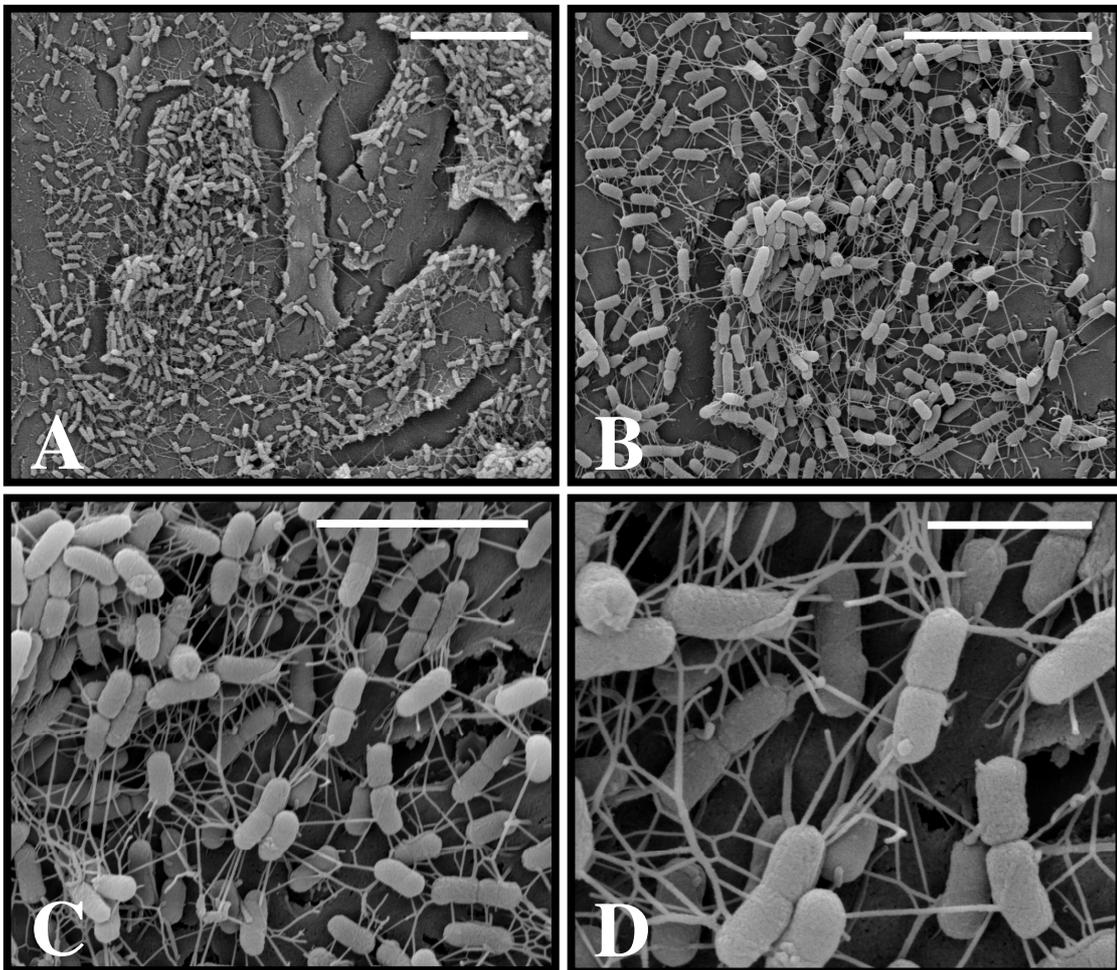


Figura 7 – Eletromicrografia de varredura da Adesão de SEPEC após 3 horas de infecção em células Vero. A= Bactérias aderidas ao longo da superfície celular. B= Detalhes de pontos de formação de microcolônias. C= Detalhes da microcolônia. D= Detalhes ampliados da rede de

Exopolissacarídeos (EPS) envolvendo a micocolônia sob a superfície celular. Aumentos: A= 600x, B= 2500x, C=10000x, D= 20000.

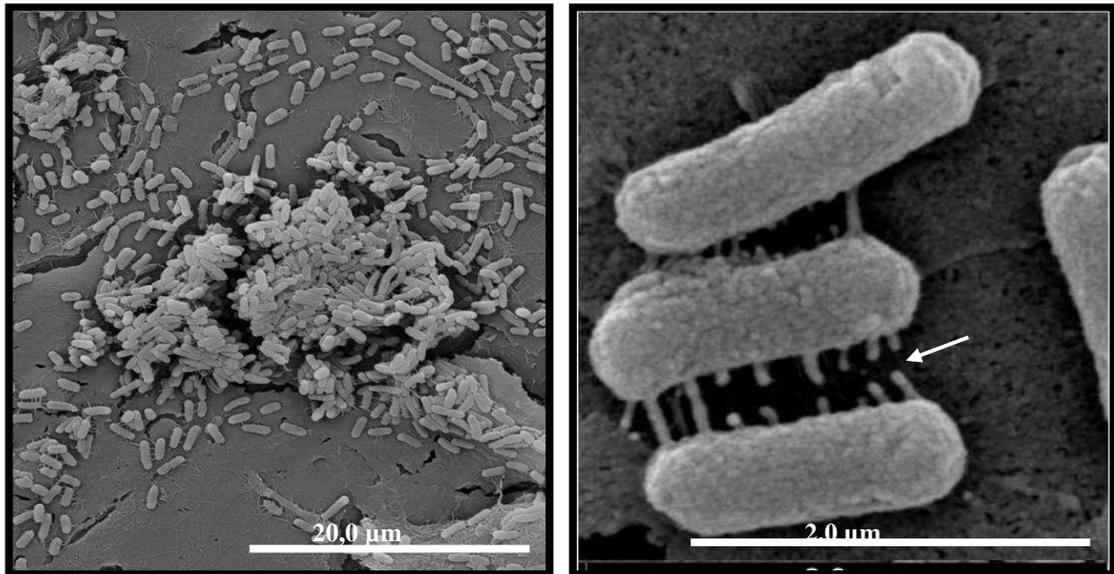


Figura 8 – Eletromicrografia de varredura da Adesão de SEPEC com 3 horas de infecção em células Vero. A= Bactérias aderidas ao longo da superfície celular, com formações de microcolônias envoltas por EPS. B= Bactérias aderidas a superfície celular em início da produção de EPS (seta). Aumentos: A= 2500x; B= 20000x.

5. Discussão

A espécie *Escherichia coli* é a bactéria Gram-negativa mais comumente isolada em casos de infecções extra-intestinais humanas, assim como em infecções urinárias, meningites e infecções sangüíneas (Russo e Johnson, 2000; Johnson *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001 e Croxen e Finlay, 2009). A patogenicidade de *E. coli* associada à sepse (SEPEC) deve-se principalmente à sua capacidade de aderir e colonizar células do hospedeiro. No entanto, são raros na literatura científica trabalhos a respeito da patogenicidade de SEPEC. Desta forma, neste trabalho, objetivamos estudar padrões de adesão, formação de biofilme e filogenia, assim como de invasão de células renais (Vero) e endoteliais (Hec-1B) por amostras de SEPEC isoladas de pacientes clinicamente diagnosticados com sepse, os quais vieram a óbito dentro de um prazo de 2 dias após internação (Ananias e Yano, 2008).

O termo biofilme é utilizado para descrever uma população microbiana envolta por uma matriz constituída de polímeros extracelulares e aderida a uma superfície (Costerton *et al.*, 1995). Os mecanismos pelos quais *E. coli* adere a superfícies e forma biofilmes ainda não estão bem definidos atualmente, contudo, sabe-se que algumas estruturas e produtos extracelulares, como flagelos, fímbria do tipo I, antígeno 43, fímbria curly e exopolissacarídeos (EPS) tem sido implicados como fundamentais na adesão e maturação do biofilme desta bactéria (Pratt e Kolter, 1998; Vidal *et al.*, 1998; e Danese *et al.*, 2000). Segundo Danese *et al.* (2000), flagelos são importantes para a interação inicial e movimento de *E. coli* ao longo das superfícies, da mesma forma como a fímbria do tipo I é requerida para a adesão inicial de *E. coli* ao substrato (Kau *et al.*, 2005). O antígeno 43 estaria envolvido na agregação e aumento do biofilme (Hasman *et al.*,

1999), a fimbria curly seria a responsável pela a adesão, agregação e desenvolvimento de sua arquitetura (Kikuch *et al.*, 2005) e o EPS estaria implicado, portanto, na constituição, estruturação tridimensional e persistência do biofilme de *E. coli* sobre os substratos (Danese *et al.*, 2000). Em nosso trabalho, através de dados fenotípicos e genotípicos do processo de adesão e formação de biofilme das amostras de SEPEC estudadas, observamos altas prevalências de amostras móveis (expressão de flagelos, 100%) positivas para adesão sobre células Vero e Hec-1B, na presença e ausência de D-manose (expressão de diferentes adesinas, 100%), e formação de biofilme em superfície inerte/poliestireno (82,2%), assim como altas prevalência dos genes: *fimH* (Fimbria do tipo I, 98,8%), *flu* (Antígeno 43, 71,4%) e *csgA* (Fímbria curly, 55,1%). Além disso, através de dados de microscopia eletrônica de varredura, observamos formações de microcolônias envoltas por EPS na adesão de SEPEC a superfícies celulares (Figuras 7 A, B, C e D; 8 A e B). Estudos têm demonstrado a importância da formação de biofilme por *E. coli* em infecções extra-intestinais, tais como infecções do trato urinário (Tiba *et al.*, 2009), principalmente no caso da cistite crônica e de infecções sanguíneas associadas ao uso de cateteres (Martínez *et al.*, 2006). Entretanto, não há dados literários a respeito da formação de biofilme por SEPEC.

De fato, a formação de biofilme por amostras de SEPEC pode demonstrar-se como um importante fator envolvido na patogenicidade apresentada por estas amostras. É possível que SEPEC seja capaz de formar biofilme também em tecidos vivos, como por exemplo, em células renais, em casos de infecções renais crônicas (pielonefrite). Infecções extra-intestinais causadas por *E. coli*, tais como infecções urinárias, como é o caso da pielonefrite, segundo Martínez et al. (2006), são comuns os casos de bacteremia, uma condição que sempre precede a sepse. Sendo assim, biofilmes de SEPEC em tecidos, como os renais, poderiam ser importantes no decorrer da

sepsse, por servir como uma fonte de SEPEC para a corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, SEPEC, em sua forma livre ou planctônica, deve possuir condições genéticas para sobreviver no soro, como mostrado por Ananias e Yano (2008), decorrendo-se então a sepsse.

É provável ainda que *fimH*, *ag43* e *csgA* estejam também envolvidos em diferentes estágios da sepsse, visto que alguns autores já descreveram a fundamental importância de *FimH* (Kau *et al.*, 2005; e Pouttu *et al.*, 1999), *Ag43* (Ulett *et al.*, 2007) e *CsgA* (Kikuchi *et al.*, 2005) em infecções do trato urinário, assim como em infecções das meninges. Além disso, *CsgA* parece exercer fundamental contribuição para anormalidades de coagulação e de pressão sanguínea contribuindo desta forma para o choque séptico causado por SEPEC (Bian *et al.*, 2000).

Nossos dados mostraram que 100% das amostras SEPEC, foram capazes de invadir células Vero e Hec-1B, o que pode ser de extrema importância para a disseminação sistêmica de SEPEC no hospedeiro. Entretanto, foram observadas baixas incidências e associações entre as diferentes invasinas estudadas, como *gimB*, *ibeA* e *tia*, 12,2%, 10,2% e 18,4% respectivamente (Tabela 5). Sendo assim, SEPEC provavelmente invade células por mais de um mecanismo, envolvendo diferentes invasinas e/ou ainda através de instabilidades provocadas pela bactéria ou toxinas, as quais podem ser liberadas na superfície celular. Logo, sugerimos o desenvolvimento de estudos mais aprofundados na descrição do processo invasivo induzido por SEPEC.

Os dados da PCR para genes responsáveis por toxinas, tais como *clyA* e *vat* mostraram frequências de 69,4% e 57,1%, respectivamente. De fato, essas toxinas podem estar envolvidas na patogenicidade de SEPEC, o que explicaria as significativas frequências nos resultados obtidos (mais de 90,0% apresetando ao menos um tipo de toxina). Além disso, os dados da microscopia eletrônica de transmissão mostraram efeitos citopáticos em células Hec-1B, o que

demonstra uma possível produção de toxinas por SEPEC. Estudos tem demonstrado atividades citolíticas e citotóxicas de citolisina A (ClyA) frente a células de mamíferos, tais como monócitos e macrófagos (Lai *et al.*, 2000). Células do sistema fagocítico polimorfonucleares tais como: macrófagos, monócitos e leucócitos, representam a primeira linha de defesa do hospedeiro frente a infecções microbianas. Sendo assim, fatores de virulência, como a ClyA podem representar uma vantagem para SEPEC em diferentes estágios da sepse, tais como invasão de células epiteliais e endoteliais. A proteína vacuolizante Vat trata-se de um importante fator de virulência para *E. coli* Patogênica Aviária - APEC (dados não publicados), no entanto não há trabalhos na literatura no que diz respeito a seu papel e função para SEPEC, entretanto nosso trabalho mostrou tratar-se de um gene freqüentemente encontrado entre nossas amostras de SEPEC (57,1%).

Estudos epidemiológicos tem relacionado o polissacarídeo capsular K1 a *E. coli* associada a Meningite Neonatal - NMEC (Achtman *et al.*, 1986 e Kim *et al.*, 1992). Em nosso trabalho, observamos que 12 amostras (24,5%) apresentaram-se positivas para o gene *neuC*, o que sugere uma relação dessas amostras de SEPEC ao grupo de NMEC (Tabela 5).

Outros genes para adesinas também foram pesquisados, tais como: *mat* (fímbria regulada pela temperatura e associada à meningite) e *iha* (adesina regulada por ferro), ambos descritos por Ewers *et al.* (2007), e encontrados para SEPEC na ordem de 38,8% e 32,7%, respectivamente. Tais freqüências, uma vez mais, nos levam a uma estreita relação entre SEPEC e MNEC.

A filogenia das amostras SEPEC demonstrou que do total das 49 amostras estudadas, 26 (53,1%) foram classificadas no grupo filogenético D, 19 (38,9%) foram classificadas no grupo B2, 4 (4,0%) no grupo B1 e 4 (4,0%) das amostras foram classificadas como pertencentes ao grupo A (Tabela 4). A maior prevalência do grupo filogenético D sobre o grupo B2 foi

semelhante ao descrito por Martínez *et al.*, 2006 para amostras de *E. coli* isoladas de bacteremias, o que se mostra distinto dos resultados descritos por Martinez-Medina *et al.* (2009) para amostras de *E. coli* Aderência-Invasiva (AIEC) de diversas fontes, assim como são distintos os dados apresentados por Tiba *et al.* (2009) para amostras de UPEC. Menores proporções dos grupos filogenéticos A e B1, foram também descritos por todos os autores supra mencionados. Os resultados obtidos quanto aos dados de filogenia foram de certa forma esperados, haja vista que amostras agrupadas nos grupos D e B2 são conhecidas por possuir, de forma geral, maior número de fatores de virulência do que *E. coli* dos grupos A e B1. Contudo, o fato de o grupo D normalmente ser mais freqüente em infecções sanguíneas, como mostrado em nossos resultados, assim como por Martínez *et al.* (2006), pode-se sugerir que ExPEC do grupo filogenético D possui maiores chances de atingir a corrente sanguínea, fato o qual poderia ocorrer por contaminação e formação de biofilmes em cateteres (Martínez *et al.*, 2006), que estão freqüentemente associados à infecção e bacteremia. No entanto, nosso trabalho não mostrou diferenças significativas entre a formação do biofilme por SEPEC e os grupos filogenéticos de ExPEC, D e B2.

Com base em nossos dados, pretendemos aprofundar nossos estudos com base na identificação de novas proteínas expressas na formação do biofilme de SEPEC, visando um melhor entendimento do processo de sua formação e importância na patogenicidade de SEPEC.

Conclusões

- SEPEC mostrou-se capaz de formar biofilme em superfícies inertes;
- Os resultados da PCR mostraram que os genes *fimH* (Fimbria do tipo I -), *flu* (Antígeno 43 -) e *csgA* (Fimbria curly -), foram os mais frequentes nas amostras estudadas;
- As amostras de SEPEC aderiram e invadiram células renais (Vero) e endoteliais (Hec-1B);
- Os genes: *mat* (38,8%) e *iha* 32,7%) foram as adesinas menos frequentes;
- Os genes de invasinas: *gimB* (12,2%), *ibeA* (10,2%) e *tia* (18,4%) foram os menos prevalentes dentre todos os estudados;
- Os genes relacionados às toxinas citolisina A (*clyA*) e proteína autotransportadora vacuolizante (*vat*) apresentaram significativa prevalência nas amostras estudadas, 69,4% e 57,1%, respectivamente;
- O gene *neuC*, relacionado ao polissacarídeo capsular K1 - associado a MNEC, esteve presente em 24,5% das amostras SEPEC estudadas;
- Filogeneticamente 92,0% das amostras SEPEC enquadraram-se dentro do grupo ExPEC.

6. Referências Bibliográficas

- Achtman, M., Heuzenroeder, M., Kusecek, B., Ochman, H., Caugant, D., Selander, R.K., Vaisanen-Rhen, V., Korhonen, T.K., Stuart, S., Orskov, F., 1986. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. **Infect. Immun.** 51, 268–276. 1986.
- Ananias, M. and Yano, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**41: 877-883, 2008.
- Ben Nasr, A., Olsen, A., Sjobring, U., Muller-Esterl, W., Bjorck, L.. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 20, 927–935. 1996.
- Bian, Z., Brauner, A., Li, Y., and Normark, S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. **J Infect Dis** 181: 602–612. 2000.
- Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Munoa F, Juárez A, Blanco J: Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Res Microbiol** 148(9):745-755. 1997.

- Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Munoa F, Juárez A, Blanco J:
Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli*
strains: Relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Res Microbiol**
148(9):745-755. 1997.
- Boddicker, J. D., Ledebor, N. A., Jagnow, J., Jones, B. D. & Clegg, S. Differential binding to
and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is
dependent upon allelic variation in the fimH gene of the fim gene cluster. **Mol Microbiol** 45,
1255–1265. 2002.
- Bonacorsi, S. P. P., O. Clermont, C. Tinsley, I. Le Gall, J. C. Beaudoin, J. Elion, X. Nassif, and
E. Bingen. 2000. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for
neonatal meningitis-associated strains. **Infect. Immun.** 68:2096-2101.
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends Microbiol.**
13(1):20-6. 2005.
- Clermont O.; Bonacorsi, S. Bingen, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli*
Phylogenetic Group. **Appl. Envir. Microb.** 66: p. 4555-4558, 2000.
- Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, E.D.; Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. Microbial
biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, 49, 711-145, 1995.

- Costerton, J. W.; P. S. Stewart and E. P. Greenberg. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science** 284:1318–1322, 1999.
- Croxen, M. A. and Finlay, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.** 8: 1-38. 2009.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades J., R. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. **J. Bacteriol.** 183: 2888–2896. 2001.
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Kolter, R. Exopolysaccharide Production Is Required for Development of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Architecture. **J. Bacteriol.** 182: 3593-3596. 2000.
- Danese, PN, Pratt, LA, Dove, SL, Kolter, R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. **Mol Microbiol** 37: 424-432. 2000.
- David, C. M. N. Infecção em UTI: Infection in the Critically Ill Patient. Simpósio: Medicina Intensiva. **Medicina Ribeirão Preto.** 31: 337-348, 1998.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**15:167-193, 2002.
- Donlan, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Em. Infect. Dis.** 8: 881-890, 2002.

- Ewers C, Li G, Wilking H, Kiebling S, Alt K, Ant ao EM, Latus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, B ohnke U, Steinr uck H, Philipp HC, Wieler LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **Inter J Med Microbiol.** 297(3):163-76. 2007.
- Gabig, M., Herman-Antosiewicz, A., Kwiatkowska, M., Los, M., Thomas, M. S., Wegrzyn, G. The cell surface protein Ag43 facilitates phage infection of *Escherichia coli* in the presence of bile salts and carbohydrates. **Microbiology** 148: 1533-1542. 2002.
- Gophna, U., Barlev, M., Seiffers, R., Oelschlager, T.A., Hacker, J., Ron, E.Z.. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. **Infect. Immun.** 69, 2659–2665. 2001.
- Hasman, H., T. Chakraborty, and P. Klemm. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. **J. Bacteriol.** 181:4834–4841, 1999.
- Johnson J.R.; Russo T.A.; Tarr P.I.; Carlino U.; Bilge, S.S.; Vary J.C.Jr; Stell, A.L. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN_{E. coli}*, among *Escherichia coli* Isolates from patients with urosepsis. **Infect Immun.** 68: 3040-3047, 2000.
- Johnson, J. R., O’Bryan, T. T., Kuskowski, M., and Maslow, J. N. Ongoing Horizontal and Vertical Transmission of Virulence Gene and *papA* Alleles among *Escherichia coli* Blood

Isolates from Patients with Diverse-Source Bacteremia. **Infect. Immun.** 69: 5363-5374, 2001.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.** 2: 123-140.

Kau, A. L.; Hunstad, D. A.; Hultgren, S. J. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. **Current Opinium in Microbiology.** 8:54-59, 2005.

Kerényi, M.; Allison, H. E.; Bártai, I.; Sonnevend A.; Emödy, L.; Plaveczyk, N.; Pál, T. Occurrence of hlyA and sheA genes in Extraintestinal *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.** 43:2965-2968, 2005.

Kim, K.S., Itabashi, H., Gemski, P., Sadoff, J., Warren, R.L., Cross, A.S., 1992. The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. **J. Clin. Invest.** 90, 897–905.

Kitajima E.W, Dolder M.A.H., Joazeiro P.P. Apostila de microscopia eletrônica de varredura. Apostila (Laboratório de Microscopia Eletrônica), Instituto de Biologia, universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1999.

- Kjærsgaard, K.; Schembri, M. A.; Hasman, H.; Klemm, P. Antigen 43 from *Escherichia coli* Induces Inter- and Intraspecies Cell Aggregation and Changes in Colony Morphology of *Pseudomonas fluorescens*. **J. Bacteriol.** 182: 4789-4796, 2000.
- Lai, X. H., Arencibia, A., Johansson, S. Wai, J. Oscarson, S. Kalfas, K. G., Sundqvist, Y. Mizunoe, A. Sjöstedt, and B. E. Uhlin. Lai, X. H., I. Arencibia, A. Johansson, S. N. Wai, J. Oscarsson, S. Kalfas. Cytocidal and apoptotic effects of the ClyA protein from *Escherichia coli* on primary and cultured monocytes and macrophages. **Infect. Immun.** 68:4363–4367. 2000.
- Martínez, J. A.; Soto, S.; Fabrega, A.; Almela, M.; Mensa, J.; Soriano, A.; Marco, F.; De Anta, M. T. J.; Vila, J. Relationship of Phylogenetic Background, Biofilm Production, and Time to Detection of Growth in Blood Culture Vials with Clinical Variables and Prognosis Associated with *Escherichia coli* Bacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, 44: 1468–1474, 2006.
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J. E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., and Garcia-Gil, L., J. Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). **BMC Microbiology.** 9:202. 2009.
- Maurer, J.J.; Brown, T.P., Steffens, W.L. & Thayer, S.G – 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.** 42: 106-118. 1998.

- Mokady, D., Gophna, U., Ron, E. Z. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.** 295: 455-462, 2005.
- O'Toole GA, Kolter R. 1998. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol.** 28:449–61. 1998.
- Olsen, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Normark, S. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. **Infect. Agents Dis.** 2, 272–274. 1993.
- Olsen, A., Jonsson, A., Normark, S.. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. **Nature** 338, 652–655. 1989.
- Olsen, A., Wick, M.J., Morgelin, M., Bjorck, L. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. **Infect. Immun.** 66, 944–949. 1998.
- Pouttu R, Puustinen T, Virkola R, Hacker J, Klemm P, Korhonen TK. Amino acid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesins is critical for the adhesiveness of meningitis-associated *Escherichia coli* to collagens. **Mol. Microbiol.** 31: 1747-1757. 1999.

- Pratt, L.A., and Kolter, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Mol Microbiol** 30: 285–293. 1998.
- Prigent-Combaret, C. et al. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 181, 5993–6002. 1999.
- Restieri, C.; Gariss, G.; Locas, M-C.; Dozois, C. M. Autotransporter-Encoding Sequences are Phylogenetically Distributed among *Escherichia coli* Clinical Isolates and Reference Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, 73: 1553-1562. 2007.
- Russo T.A & Johnson J.R. "A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC." *J. Infect. Dis.* 181(5): 1753-1754. 2000.
- Scaletsky, I. C. A., Silva, M. L. M., and Trabulsi, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hella cells. **Infet. Immun.** 45:534-536. 1984.
- Schembri, M. A., Hjerrild, L., Gjermansen, M., Klemm, P. (2003). Differential Expression of the *Escherichia coli* Autoaggregation Factor Antigen 43. **J. Bacteriol.** 185: 2236-2242. 2003.
- Selander, R. K., D. A. Caugant, and T. S. Whittam. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, p. 1625–1648. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and

Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C, 1987.

- Sjobring, U., Pohl, G., Olsen, A.. Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). **Mol. Microbiol.** 14, 443–452. 1994.
- Speert, D. P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M. & Mahenthiralingam, E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. **Emerg Infect Dis** 8, 181–187. 2002.
- Stewart, P.S. and Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet** 358, 135–138. 2001.
- Teng, C.-H., Cai, M., Shin, S., Xie, Y., Kim, K.-J., Khan, N. A., Di Cello, F., Kim, K. S. *Escherichia coli* K1 RS218 Interacts with Human Brain Microvascular Endothelial Cells via Type 1 Fimbria Bacteria in the Fimbriated State. **Infect. Immun.** 73: 2923-2931. 2005.
- Tiba, M. R., Nogueira, G. P., Leite, D. S. Study on virulence factors associated with biofilm formation and phylogenetic groupings in *Escherichia coli* strains isolated from patients with cystitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** . 42(1):58-62, 2009.
- Ulett GC, Mabbett AN, Fung KC, Webb RI, Schembri MA. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. **Microbiology.** 157: 2321-2331, 2007.

- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., Lejeune, P. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 Mutant Strain Able To Form Biofilms on Inert Surfaces: Involvement of a New ompR Allele That Increases Curli Expression. **J. Bacteriol.** 180: 2442-2449. 1998.
- Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microb Infect.** 4:481-9. 2002.
- Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J., Nataro, J. P., Sarantuya, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M. and Kawano, Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 71: 687-690, 2004.
- Watnick PI, Fullner KJ, Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. **J. Bacteriol.** 181(11):3606–9. 1999.
- Watt, S., Lanotte, P., Mereghetti, L., Moulin-Schouleur, M., Picard, B., Quentin, R., 2003. *Escherichia coli* strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors. **J. Clin. Microbiol.** 41, 1929–1935.
- Webb, J.S. et al. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **J. Bacteriol.** 185, 4585–4592.
- Yang, H. H; Vinopal, R. T. Grasso, D.; Smets, B. F. High diversit among environmental

Escherichia coli isolates from a bovine feedlot. **Appl. Environ. Microb.** 70:1528-1536, 2004.

Zogaj, X. *et al.* The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Mol. Microbiol.** 39, 1452–1463. 2001.