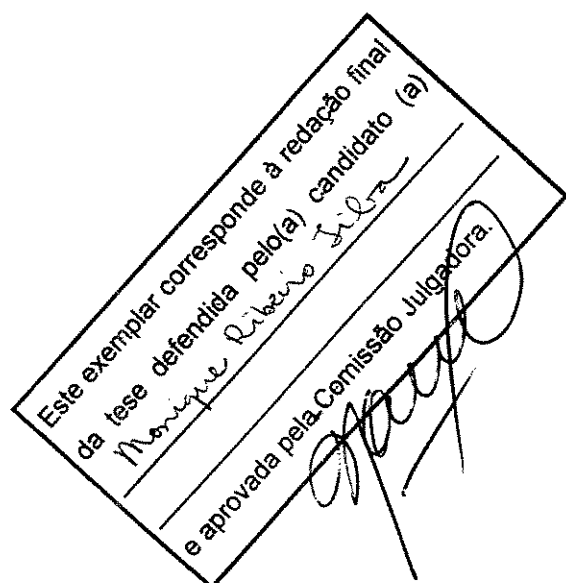


Universidade Estadual de Campinas



Monique Ribeiro Tiba

**Determinação Genotípica dos Fatores de Virulência
em amostras de *Escherichia coli* isoladas de cistite**



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

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Co-Orientador: Prof. Dr Tomomasa Yano

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DADE / 21
CHAMADA T/UNICAMP
T432d
EX
VBO BC/ 57 586
DC 16-117-04
D α
EÇO 11,00
TA 15/04/2004
CPD

CM00196140-1

BIBID. 313806

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

T432d

Tiba, Monique Ribeiro

Determinação genotípica dos fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de cistite / Monique Ribeiro Tiba. --
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Domingos da Silva Leite

Co-orientador: Tomomasa Yano

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

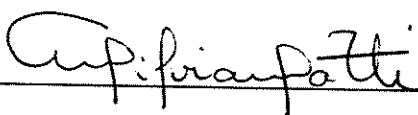
1. Infecção. 2. Trato urinário. 3. Virulência. 4. Toxinas. 5. Reação em cadeia da polimerase. I. Leite, Domingos da Silva. II. Yano, Tomomasa. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Banca Examinadora

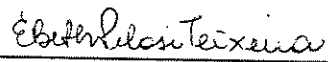
Prof. Dr. TOMOMASA YANO(Orientador)



Profa. Dra. MARIA SILVIA VICCARI GATTI



Profa. Dra. ELISABETH PELOSI



Instruir - te- ei e ensinar - te - ei o caminho que debes seguir; guiar - te - ei com os meus olhos (Salmos 32:8).

*Aos meus pais, Dario e Regina, pelo amor, dedicação e incentivo durante toda
minha vida.*

A minha avó, pelo carinho e incentivo.

Reconhecimento

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pela admirável competência e ensinamento profissional. Pela orientação segura e convivência harmoniosa durante a execução deste trabalho e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

Agradecimentos

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, incentivo e colaboração fundamental para o desenvolvimento e conclusão desta etapa de minha vida. Agradeço em especial a Shee, Baby, Bono e Tininha.

Ao André, pelo carinho, compreensão e amor incondicional, pela disponibilidade e apoio durante toda a execução deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, por ter me recebido como sua orientada e ter confiado no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pela co-orientação, apoio e disponibilidade no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Dr. Aureo Tatsumi Yamada e Dr. Paulo Pinto Joazeiro por terem participado da minha Iniciação Científica.

À Prof. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti, pelo apoio, paciência e incentivo durante a participação no PED, no estágio no laboratório de Cultura Celular e na disciplina de Virologia.

À Dário e Clarice que tanto me ajudaram neste começo de carreira, pelo carinho, e apoio.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Alex, Carol, Cláudia, Cris, Geórgio, Luciana, Paty, pelo incentivo, auxílio e companherismo.

Ao Erivaldo, pela disponibilidade e apoio técnico fundamental para a execução deste trabalho.

À Ana, pelo apoio e ensinamento durante o estágio no Laboratório de Cultura Celular.

Às biólogas Paula e Mirtis, pelo apoio e disponibilidade durante o desenvolvimento deste trabalho e na participação do PED.

As minhas amigas Eliane, Giuliana e ao Davi, que mesmo à distância, sempre me incentivaram.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ABSTRACT	ix
RESUMO	x
I- INTRODUÇÃO	1
1-Infecção do Trato Urinário (ITU)	1
2- <i>Escherichia coli</i> extraintestinal:	2
3- Fatores de Virulência (FV) de ExPEC	4
3.1: Adesinas associadas à ITU	5
3.1.1: Fímbria do Tipo 1	6
3.1.2: Fímbria P	9
3.1.3: Fímbria S	11
3.1.4: Fímbria do Tipo 1C (F1C)	13
3.1.5: Adesinas da família Afa	13
3.2: Toxinas	16
3.2.1: Hemolisina	16
3.2.2: Fator Necrozante Citotóxico do tipo1 (CNF-1)	19
3.2.3: Toxina Citoletal Distensora (CDT)	21
3.3: Cápsula	23
3.4: Aerobactina	24
3.5: Proteína específica Uropatogênica (usp)	26
II- OBJETIVOS	28
III-MATERIAL E MÉTODOS	29
IV-RESULTADOS	33
V-DISCUSSÃO	43
VI-CONCLUSÕES	55
VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ABSTRACT

Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) causes several extraintestinal infections, including cystitis and pyelonephritis. Adhesin-encoding operons (*pap*, *sfa/foc*, *fim* and *afa*), toxins (α -hemolysin and Cytotoxic Necrotizing Factor type 1), iron acquisition systems (aerobactin), host defense avoidance mechanisms (capsule or LPS), uropathogenic specific protein (USP) have been shown to be prevalent in *E.coli* strains associated with urinary tract infections. In this work, 162 Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains from patients with clinical signs of cystitis were genotypically characterized by use of the polymerase chain reaction (PCR) assay. We developed and validated a multiplex PCR assay for virulence-related genes *papC*, *papE/F*, *papG* alleles, *fimH*, *sfa/foc*, *afaE*, *hly*, *cnf-1*, *usp*, *cdtB*, *iucD*, and *kpsMTIII*, previously identified in UPEC strains. The results of the PCR assay identified 154 *fimH*⁺, 86 *kpsMTIII*⁺, 53 *papC/papEF/papG*⁺, 45 *sfa*⁺, 42 *iucD*⁺, 41 *hly*⁺, 36 *usp*⁺, 30 *cnf-I*⁺ and 10 *afa*⁺ strains. Cytolethal distending toxin gene was not detected, and no urovirulence-genes were detected in four strains. The PCR assays can be utilized for clinical use to detect UPEC strains and molecular epidemiological studies. PCR method is highly specific and a powerful genotypic assay for detection of adhesin-encoding operons and other virulence factors that can also contribute to virulence, promoting association between these virulence factors present in UPEC.

RESUMO

Escherichia coli Patogênica Extraintestinal (ExPEC), está associada a infecções extraintestinais ocasionando infecções no trato urinário (UTI), incluindo cistite e pielonefrite. Também é responsável por casos de meningite, sepse neonatal e bacteremia. Adesinas associadas a ExPEC (*fim*, *pap*, *sfa/foc* e *afa*), toxinas (α -hemolisina, fator necrozante citotóxico do tipo 1), sistema de aquisição de ferro (aerobactina), mecanismos de resistência ao soro e à fagocitose (LPS e cápsula), proteína uropatogênica específica (Usp) tem sido demonstrado serem prevalentes em amostras de *E.coli* associadas a ITU. Neste trabalho, 162 *E.coli* uropatogênicas (UPEC), provenientes de pacientes com sinais clínicos de cistite, foram genotipicamente caracterizadas pelo uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram padronizados ensaios de PCR para 14 genes de fatores de virulência já descritos na literatura: *papC*, alelos *papG* (I, II, III), *papE/F*, *sfa/foc*, *fimH*, *afaB/C*, *hly*, *cnf-1*, *iucD*, *kpsMTIII*, *usp* e *cdtB*. Os resultados da PCR identificaram 154 amostras *fimH*⁺, 86 amostras *kpsMTIII*⁺, 53 *papC/papEF/papG*⁺, 45 *sfa*⁺, 42 *aer*⁺, 41 *hly*⁺, 36 *usp*⁺ 30 *cnf-I*⁺ e 10 *afa*⁺. O gene *cdtB* não foi detectado em nenhuma das 162 amostras e nenhum fator de virulência foi detectado em apenas 4 amostras. Estudos epidemiológicos da infecção do trato urinário estão sendo facilitados pelos avanços da tecnologia da PCR e pelo aumento dos dados de sequenciamento. Este trabalho teve como objetivo um estudo epidemiológico visando caracterizar genotipicamente amostras de *E.coli* isoladas de pacientes apresentando quadro clínico de cistite, definindo a frequência e associação dos fatores de virulência encontrados em UPEC.

I-INTRODUÇÃO

1-Infecção do Trato Urinário (ITU)

Ao trato urinário estão associados sítios comuns de infecções bacterianas, na uretra (uretrite), nos ureteres (ureterite), na bexiga (cistite) e nos rins (pielonefrite), usualmente pela via ascendente, acarretando diferentes tipos de resposta inflamatória local (Mulvey *et al*, 2000; Mulvey, 2002).

Cistite é uma infecção vesical, cujos sintomas típicos são causados pela inflamação da bexiga e uretra. É caracterizada pela disúria (dor e ardência no início, durante e após a micção), urgência urinária, desconforto suprapúbico, frequência urinária de pequenos volumes e geralmente não ocasiona febre. Já os sintomas da pielonefrite, infecção do parênquima renal e sistema coletor, incluem dor localizada no flanco combinada com sintomas como febre, calafrios, prostração. Em aproximadamente 30% dos casos de pielonefrite há complicação pela bacteremia, acompanhado por sepse (Garcia & Le Bouguénec, 1996; Mulvey, 2002).

Na ausência de anormalidades funcionais no trato urinário, as mulheres são mais propensas a ITU do que os homens, devido a diferenças anatômicas e fisiológicas. Mulheres grávidas freqüentemente desenvolvem bacteriúria assintomática, com alto risco de desenvolvimento de pielonefrite aguda. Já em crianças, as ITU são geralmente o sinal de anormalidades urológicas, como refluxo vesico-ureteral, sendo esta a mais freqüente (30-40% dos casos). Em idosos, ITU freqüentemente são assintomáticas, constituindo um risco uma vez que, dois terços dos casos estão localizados no trato urinário superior (Garcia & Le Bouguénec, 1996).

Infecções do trato urinário (ITU), incluindo cistite e pielonefrite, afetam uma grande proporção da população mundial, sendo importante pela morbidade significativa e altos custos médicos. *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) é o principal agente causador de ITU comunitárias (70-95%) e por 50% de todos os casos de ITU nosocomiais (Mulvey *et al*, 2000). Embora ITU sejam tipicamente fáceis de detectar e curar, determinadas situações inerentes aos hospedeiros podem determinar por cuidados adequados e efetivos, como a idade do paciente, o sexo, o nível de risco de infecção com patógenos resistentes, gravidez, e outros.

2- *Escherichia coli* extraintestinal (ExPEC)

Escherichia coli é o patógeno mais comum encontrado em infecções do trato urinário. Esta bactéria pertence à família *Enterobacteriaceae*, faz parte da microbiota intestinal de mamíferos, caracterizando-se por ser um bacilo gram-negativo, anaeróbico facultativo, podendo causar infecções intestinais e extra-intestinais (Mol & Oudega, 1996; Féria *et al*, 2001).

Escherichia coli Extraintestinal Patogênica (ExPEC) são linhagens de *E.coli* que ocasionam a maioria das infecções extraintestinais. As infecções mais comuns são as infecções no trato urinário, bacteremia e sepse. ExPEC também é responsável por casos de meningite e sepse neonatal que, frequentemente, ocasionam sérias seqüelas e morte (Johnson & Russo, 2002).

Apesar de sua importância médica, infecções extraintestinais causadas por ExPEC, não prenderam a atenção da saúde pública, como *E.coli* patogênicas intestinais e suas síndromes associadas. Este fato pode ser explicado porque, diferentemente da *E.coli* O157:H7, associada à Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS), infecções por ExPEC não

levam a epidemias, não derivam de alimentos contaminados e, em muitas circunstâncias, causam somente baixa morbidade ou afetam hospedeiros comprometidos. Além disso, enquanto a infraestrutura da saúde pública trabalha agressivamente para detectar e estudar as infecções intestinais, não há comparável estudo com ExPEC (Johnson & Russo, 2002).

A *E.coli* extraintestinal patogênica responsável pela maioria de infecções em hospedeiros não comprometidos são distintas da *E.coli* comensal e da *E.coli* patogênica intestinal, em relação ao grupamento filogenético e aos fatores de virulência encontrados. Russo & Johnson (2000) propuseram uma nova designação para estas linhagens de *E.coli*, que ocasionam infecções extraintestinais, denominando-as de ExPEC - Extraintestinal Pathogenic *E.coli*. Primeiramente, um isolado clínico de *E.coli* poderia ser definido como uma linhagem ExPEC se possuísse fatores de virulência extraintestinais reconhecidos, ou se demonstrasse aumento na virulência em apropriado experimento de infecção extraintestinal utilizando um modelo animal. Somente o isolamento de uma linhagem de *E.coli* em um paciente com infecção extraintestinal não confere a designação ExPEC, uma vez que linhagens comensais podem ocasionar infecções em hospedeiros comprometidos.

Logo, baseando-se em ambos os critérios genéticos e clínicos, as linhagens de *E.coli* foram classificadas em três principais grupos: linhagens comensais, linhagens patogênicas intestinais e linhagens patogênicas extraintestinais (Russo & Johnson, 2000).

Linhagens de *E.coli* comensais tipicamente derivam dos grupos filogenéticos A ou B1 e também pela ausência de fatores de virulência. Em contraste, os vários tipos de *E.coli* patogênicas intestinais, que raramente ocasionam doenças extraintestinais, derivam dos grupos filogenéticos A, B1 ou D e por possuírem fatores de virulência característicos de suas síndromes diarreio gênicas. Já as ExPEC derivam, predominantemente, do grupo filogenético B2 e em menor extensão do grupo D, podendo ser reconhecidas por suas

características baseadas no sorotipo O: K: H e por exibirem uma ampla variedade de fatores de virulência, os quais permitem colonizar a superfície da mucosa do hospedeiro, evitar mecanismos sistêmicos de defesa do hospedeiro, capturar nutrientes essenciais como ferro, causar injúria e invasão no tecido hospedeiro (Johnson *et al*, 2001; Johnson & Russo, 2002; Johnson & Stell, 2000; Obata-Yasuoka *et al*, 2002).

3- Fatores de Virulência (FV) de ExPEC

Para efetivamente colonizar e causar doença no hospedeiro, muitos patógenos bacterianos desenvolveram mecanismos necessários para colonizar, invadir e persistir no tecido do hospedeiro, uma vez que, após a entrada no trato urinário, a *E. coli* Uropatogênica (UPEC) fica exposta ao sistema de defesa constitutivo e induzido do hospedeiro, que inclui o fluxo urinário, numerosas moléculas antibacterianas, como a proteína Tamm-Horsfall, e o influxo de células efectoras do sistema imune (Garcia & Le Bouguénec, 1996; Mulvey, 2002).

Entre os sorogrupos mais freqüentemente presentes em infecções do trato urinário encontramos O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 e O75 (Orskov & Orskov, 1985; Blanco *et al*, 1992; Garcia & Lê Bouguénec, 1996). Isolados de UPEC são um grupo geneticamente heterogêneo e podem variar significativamente em suas habilidades de colonizar e persistir na bexiga e nos rins (Mulvey, 2002). Estudos vêm indicando que determinados fatores de virulência expressos por UPEC podem modular a virulência bacteriana dentro do trato urinário. Estes fatores de virulência estão comumente organizados em blocos gênicos no DNA cromossômico, formando ilhas de patogenicidade (PAI) (Hacker & Kaper, 2000; Guyer *et al*, 2001; Mulvey, 2002; Oelschlager *et al*, 2002).

A aderência de *E. coli* nas células uroepiteliais é o passo inicial relacionado à patogênese da infecção. Este evento frequentemente promove a multiplicação bacteriana e, em alguns casos, ocasiona invasão nas células epiteliais. A adesão específica é mediada por proteínas bacterianas denominadas adesinas, que podem ou não estar associadas a fimbrias, e se ligam especificamente aos diferentes receptores glicoconjugados (Mol & Oudega, 1996; Smyth *et al*, 1996; Garcia & Lê Bouguénec, 1996).

Além da aderência bacteriana, outros fatores de virulência podem contribuir para a uropatogenicidade, como a produção de α -hemolisina (Hly), do fator necrosante citotóxico do tipo 1 (CNF-1), a produção de sideróforos, a resistência à atividade bactericida do soro e à fagocitose. Esta multiplicidade e a associação de FV têm sido importantes fatores no desenvolvimento de ITU podendo aumentar a patogenicidade de um isolado de UPEC. (Yamamoto *et al*, 1995; Blanco *et al*, 1997 a; Morin & Hopkins, 2002).

3.1- Adesinas associadas a ITU

Adesinas são componentes protéicos localizados na superfície bacteriana, que promovem a ligação específica para os receptores presentes em células eucarióticas. Em muitos casos, as adesinas bacterianas estão associadas com apêndices filamentosos protéicos denominados fimbrias, que irradiam a partir da superfície bacteriana. Em geral, fimbrias são organelas heteropoliméricas compostas de subunidades principais e subunidades menores. Embora as características adesivas possam ser conferidas pela subunidade principal, a adesina é frequentemente um complexo formado por subunidades menores presentes no topo da fimbria ou intercalada em pontos distintos ao longo deste filamento (Kuehn, *et al* 1994; Mol & Oudega, 1996).

Um grande número de adesinas produzidas pela UPEC têm sido descritas e identificadas de acordo com sua morfologia (adesinas associadas ou não a fimbria), propriedade hemaglutinante, sorológica, e com sua especificidade ao receptor. Os receptores estão presentes em células uroepiteliais, eritrócitos e também no glicocálice urinário. Entretanto, adesinas bacterianas podem se ligar especificamente a componentes da matriz extracelular como fibronectina, laminina ou colágeno (Garcia & Lê Bouguénec, 1996). Em UPEC foram descritas as adesinas fimbriais do tipo 1, P, S, F1C e adesinas afimbriais.

3.1.1: Fimbria do Tipo 1

Fímbricas do Tipo 1 são freqüentemente referidas como fímbricas somáticas, sendo encontradas em aproximadamente 80% das linhagens de *E.coli*. Uma bactéria expressando a fimbria do tipo 1 geralmente possui 200-500 apêndices fimbriais arranjados em sua superfície. Cada apêndice fimbrial tem 1-2µm de comprimento e 7nm de diâmetro, sendo constituído por um heteropolímero formado pelas proteínas de subunidade principal FimA e três proteínas de subunidades menores: FimF, FimG e FimH. A expressão e montagem desta fimbria requerem pelo menos oito genes cromossômicos presentes no operon *fim*, que além de codificar componentes estruturais, codifica tanto a maquinaria biossintética quanto os elementos regulatórios (Thankavel *et al*, 1997; Schembri *et al*, 2001; Schilling *et al*, 2001).

A expressão da fimbria do tipo 1 é variável, com células individuais mudando entre estados fimbriados e não-fimbriados. Esta característica é devido à presença de um segmento de DNA de 314pb (elemento invertido) localizado imediatamente amontante (upstream) do promotor de *fimA*. Quando o elemento invertido está na posição ON, o

promotor está na orientação correta para transcrição dos genes fimbriais, entretanto, quando o elemento está na posição OFF, a orientação do promotor não permite a transcrição e a fimbria não é expressa. Os elementos regulatórios envolvidos na mudança de fase são as subunidades menores (*fimB* e *fimE*), temperatura e meio de crescimento (Guyer *et al*, 2001; Schembri *et al*, 2001; Mulvey, 2002).

A propriedade de adesão da fimbria do tipo 1 foi detectada na subunidade menor fimbrial FimH, localizada na porção distal da fimbria. A subunidade principal FimA pode ser montada como um apêndice fimbrial sem a presença de subunidades menores, portanto, estas fimbrias não possuem capacidade de adesão. Nas células bacterianas que possuem um fenótipo de adesão, a presença da subunidade maior não é requerida, pois há necessidade apenas de duas proteínas adaptadoras FimF e FimG que se associam com FimH formando a adesina (Gunther IV *et al*, 2001). A fimbria do tipo 1 caracteriza-se pela capacidade de aglutinar eritrócitos de cobaia *in vitro*, de forma sensível à manose (HMS). Esta hemaglutinação sugere que as glicoproteínas com cadeias oligomanose N-ligado, podem atuar como moléculas receptoras, sendo estas encontradas em abundância na superfície de mucosas (Mulvey *et al*, 2000; Schembri *et al*, 2001; Mulvey 2002).

A adesina FimH possui um número de variantes naturais, que diferem em poucos aminoácidos, podendo conferir distintos fenótipos de aderência para a fimbria do tipo 1. Todas as variantes naturais de FimH podem ligar-se a estruturas trimanoses, mas podem diferir em sua habilidade de associar a um número de outros receptores, incluindo resíduos monomanose, colágeno do tipo I e IV, laminina e fibronectina. O receptor primário da fimbria do tipo 1 dentro da bexiga parece ser a glicoproteína de membrana integral uroplaquina 1a (UP1a). A expressão desta glicoproteína pelas células epiteliais presentes no lúmen da bexiga, é o alvo primário das UPEC após a entrada no trato urinário, além disso, a

interação bacteriana com o glicocálice que recobre a superfície da bexiga parece também facilitar a colonização do trato urinário (Mulvey, 2002).

Enquanto a associação de FimH com resíduos monomanose aumentam as interações entre os receptores da uroplaquina com a bactéria, facilitando a colonização no trato urinário inferior, em outros sítios do hospedeiro esta associação pode ser prejudicada. Em determinados sítios a bactéria pode encontrar inibidores solúveis que possuem afinidade pelos resíduos de manose, sendo então uma desvantagem para a sobrevivência e estabelecimento da UPEC. No trato urinário, a expressão de variantes FimH com afinidade por resíduos monomanose podem, potencialmente, complicar a colonização bacteriana, devido à afinidade de FimH com receptores de glicoproteínas solúveis presentes na urina. Uma das proteínas mais abundantes é a proteína Tamm-Horsfall, que recentemente tem demonstrado preferência pelas variantes que se ligam aos resíduos monomanose, podendo então prevenir a aderência nas células uroepiteliais (Pak *et al*, 2001, Mulvey *et al* 2001).

Estudos vêm demonstrando que além da capacidade de adesão, a adesina FimH pode promover invasão em células epiteliais na bexiga (Schilling *et al*, 2001; Mulvey, 2002). Ensaio de internalização utilizando esferas de látex revestidas com a proteína FimH em complexo com a chaperona FimC, têm demonstrado que estas proteínas são necessárias e suficientes para promover a entrada em células epiteliais da bexiga. Esferas revestidas com soro albumina bovina, ou somente a proteína FimC purificada, não foram internalizadas. Estes dados demonstram que FimH é suficiente para promover a internalização na ausência de outros fatores bacterianos, e demonstra que esta invasão bacteriana não é simplesmente o resultado de uma fagocitose não-específica de partículas aderentes (Schilling *et al*, 2001).

O processo de internalização ocorre através de um mecanismo que provoca o rearranjo no citoesqueleto de actina na célula do hospedeiro, necessário para o englobamento e internalização da bactéria. Após a entrada, a *E.coli* do tipo 1 é usualmente encontrada no interior de vacúolos associados à membrana, e parecem não ser imediatamente levadas para a via de degradação lisossomal (Mulvey *et al*, 2001). Uma vez internalizada, a UPEC pode se multiplicar convertendo fatores presentes nas células epiteliais da bexiga do hospedeiro em fatores bacterianos. Em contraste, linhagens laboratoriais, embora capazes de invadir e persistir muitas vezes no interior de células epiteliais da bexiga, são incapazes de se multiplicar intracelularmente. Estes achados sugerem que o crescimento intracelular não é uma propriedade geral de todas as linhagens de *E.coli* e requerem a expressão dos fatores de virulência únicos de UPEC. *In vivo*, a replicação celular massiva é limitada entre as células epiteliais altamente diferenciadas que revestem a bexiga. Isto sugere que sinais emitidos pelas células infectadas do hospedeiro podem também modular a habilidade da UPEC crescer intracelularmente (Mulvey *et al* 2001; Mulvey 2002).

3.1.2- Fímbria P

A denominação da fímbria P teve origem em seu receptor celular, uma vez que este faz parte do antígeno do grupo sanguíneo P. Outras denominações podem ser pilus “pap” (pyelonephritis-associated pili), pilus “prs” (pap-related sequences) ou pilus “Gal-Gal”. (Källenius *et al*, 1981; Svenson *et al*, 1983). São freqüentemente associadas aos sorogrupos 01, 02, 04, 06, 07 e 016 (Blanco *et al*, 1992).

A fímbria P é composta por subunidades, consistindo de uma adesina presente no topo de um apêndice curto e flexível denominado fibrila. Na porção distal da fibrila

encontram-se a adesina PapG, em associação com três outras subunidades menores PapE, PapF, PapK, que se encontram ligadas a uma estrutura rígida, que por sua vez é composta por subunidades de PapA repetidas. Junto à membrana externa encontra-se a subunidade PapH, atuando como âncora desta estrutura, na proteína de membrana externa (PapC) (Kuehn *et al*, 1994; Mulvey, 2002).

A fimbria P é codificada pelo operon *pap* (pili associado com pielonefrite) ou *prs* (seqüências relacionadas com *pap*) e a adesão na superfície uroepitelial é mediada por moléculas de adesinas PapG. Existem três variantes moleculares de PapG denominados Classes I, II, III. Estudos sugerem que estes três alelos diferenciam-se na especificidade do hospedeiro e tipo de ITU causada pela bactéria. O alelo *papGI* é encontrado em isolados de fezes, o alelo *papGII* está associado à pielonefrite e o alelo III de *papG* está associado com cistite (Karkkainen *et al*, 1998, Johnson *et al*, 2000; Féria *et al*, 2001, Mulvey, 2002).

Estudos demonstraram que a deleção do gene *papG* não tem efeito na formação da fimbria, mas significativamente implica na perda de adesão bacteriana em seus receptores glicanos, que são respectivamente o globotriaosilceramida (Gb3), globotetraosilceramida (Gb4) e antígeno Forsmann (Gb5), encontrados em eritrócitos e células renais (Féria *et al*, 2001; Mulvey, 2002).

O gene *papC* expressa a proteína de membrana externa (PME). Esta estrutura é responsável pela habilidade de remover as subunidades protéicas dos complexos chaperonas, incorporando as subunidades para junto da fimbria. O complexo adesina-chaperona possui alta afinidade com a proteína de membrana externa, e complexos estáveis chaperona-adesina-PME parecem iniciar a biogênese da fimbria *in vivo* (Thanassi *et al*, 2002). Na ausência da proteína de membrana externa, os complexos do sistema de secreção podem ser acumulados no periplasma, mas nenhuma fimbria é montada ou secretada

(Thanassi *et al*, 2002). Kuehn *et al* (1994), propõe que na ausência de *papC*, as subunidades da fimbria são montadas no periplasma em complexo com a chaperona.

Estudos têm demonstrado que as fimbrias P estão intimamente associadas com pielonefrite e, em menor significância, à cistite (Sussman, 1997). Além da colonização do trato urinário, a fimbria P facilita o estabelecimento de bacteriúria por isolados de UPEC, ocasionando bacteriúria assintomática (Wullt *et al*, 2001; Mulvey, 2002).

3.1.3: Fimbria S

Adesinas fimbriais S são predominantemente freqüentes em ExPEC que causam meningite neonatal e septicemia. Também são encontradas em isolados de infecções na bexiga e rim (Ott *et al*, 1988; Dobrindt *et al*, 2001; Mulvey 2002).

As adesinas S aglutinam eritrócitos humanos em presença de D-manose, logo possuem capacidade hemaglutinante resistente à manose (HMR). A hemaglutinação pode ser eliminada pelo tratamento prévio dos eritrócitos com a enzima neuraminidase, uma vez que esta enzima retira os resíduos de ácido siálico das hemácias (Sokolowska-Kohler *et al*, 1997; Sakarya *et al*, 2003). Genotipicamente, a fimbria S é composta por nove genes cromossômicos presentes no operon *sfa*, que estão envolvidos na sua biogênese e estrutura. A subunidade principal SfaA, forma o apêndice fimbrial principal que está associada a três subunidades menores SfaG, SfaH e SfaS. A molécula de adesina foi isolada e caracterizada, sendo codificada pela sequência *sfaS* que produz uma proteína de 12 kDa (Ott *et al*, 1988). A subunidade SfaS tem sido localizada na porção distal da fimbria e adere a receptores celulares compostos por glicoconjugados que contêm ácido siálico, expressos no epitélio renal e células endoteliais vasculares, sendo freqüentemente causadoras de meningite

neonatal, septicemia e infecções do trato urinário (Ott *et al*, 1988; Sarén *et al*, 1999; Mulvey, 2002).

O bloco gênico da fimbria S (*sfa*) possui alta sequência de homologia com o bloco gênico *foc* (73,3%), que codifica para a fimbria do tipo 1C (F1C). Apesar de demonstrarem similaridades na sequência gênica, e exibirem epítomos comuns nas proteínas fimbriais, os antígenos da fimbria S e F1C diferem na sua especificidade pelos receptores e em regiões responsáveis pela especificidade sorológica (Khan *et al*, 2000; Backhed *et al*, 2002).

Embora a presença da fimbria S esteja associada à pielonefrite, foi verificado resíduo de ácido siálico na Uroplaquina 3 (UP3), que é uma das quatro proteínas de membrana integrais que revestem a superfície do lúmen da bexiga, e são altamente conservadas entre todas as espécies de mamíferos. Este achado sugere que a fimbria S também possa participar de infecções urinárias na bexiga (Malagolini *et al*, 2000; Mulvey, 2002).

Estudos epidemiológicos são frequentemente baseados em ensaios fenotípicos associados aos antígenos O2, O6, O18, O83 e hemaglutinação. Porém, tendo em vista que a fimbria S é fortemente regulada por sinais ambientais como temperatura, osmolaridade e condições de crescimento, ensaios moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou sondas de DNA estão sendo cada vez mais utilizados, uma vez que, estudos fenotípicos podem ser afetados pela variação de fase fimbrial, ou pela dificuldade de expressão da fimbria em condições laboratoriais (Ott *et al*, 1988; Sokolowska-Kohler *et al*, 1997).

3.1.4: Fimbria do Tipo 1C (F1C)

A fimbria do tipo 1C tem sido descrita como um fator de adesão não-hemaglutinante, associada aos antígenos O4, O6 e O75 e expressa por aproximadamente 14% de linhagens de *E.coli* conhecidas por ocasionar ITU (Khan *et al*, 2000). O complexo fimbrial é formado pelo operon *foc* composto de oito genes, necessários para a biogênese de F1C. A fimbria é formada pela proteína da subunidade principal FocA (16kDa) e pelas proteínas de subunidades menores, FocF (17kDa), FocG (15kDa) e FocH (30kDa) (Khan *et al*, 2000).

E.coli expressando F1C tem sido encontrada aderindo-se a células epiteliais dos túbulos distais e coletores, nas células uroepiteliais dos rins e bexiga. O receptor específico foi recentemente identificado e foi demonstrado que a fimbria F1C interage seletivamente com glicosíngolipídeos isolados do trato urinário. Os compostos isolados foram caracterizados como galactosilceramida e globotriaosilceramida. O receptor galactosilceramida estava presente na bexiga, ureteres e rim, enquanto globotriaosilceramida estava presente somente no rim (Khan *et al*, 2000; Backhed *et al*, 2002).

3.1.5: Adesinas da família Afa

Em 1984, Vaisanen-Rhen e Labigne-Roussel *et al*, descreveram uma nova adesina cujo receptor era desconhecido, mas associada ao sorogrupo O75, sendo então denominada adesina O75X. Posteriormente, três grupos de novas adesinas foram clonadas independentemente, tendo sido observada uma organização genética muito similar entre elas. Os clones eram a adesina Dr, adesina afimbrial (AFA-I e AFA-3) e F1845 (Nowicki *et al*, 2001).

Nowicki *et al* (1990) demonstraram que todas estas adesinas, incluindo O75X, possuíam como receptor um antígeno do grupo sanguíneo Dr, denominado DAF - Decay Accelerating Factor, uma glicoproteína (70kDa) regulatória do complemento, que protege os tecidos do hospedeiro dos danos do sistema complemento, inibindo a formação das convertases C3 e C5. Este receptor é amplamente distribuído pelas superfícies epiteliais da mucosa gastrointestinal, pelve renal, uretra, bexiga e mucosa uterina, sendo proposto a mudança do nome de adesina O75X para hemaglutinina Dr.

A hemaglutinina Dr (O75X), é caracterizada pela hemaglutinação resistente a manose (HMR), sendo que moléculas que contêm tirosina ou o cloranfenicol inibem sua hemaglutinação. São mais freqüentemente encontradas nos sorogrupos O2, O12 e O75 (Blanco *et al*, 1992). Em estudos sobre tropismo renal, os sítios para ligação da adesina Dr foram localizados tanto nos compartimentos intersticiais do rim, quanto associadas à membrana basal dos túbulos renais e aos glomérulos da cápsula de Bowman, devido a habilidade de ligarem-se a um receptor adicional como o colágeno do tipo IV (Westerlund *et al*, 1989; Nowicki *et al*, 2001). É proposto que membros da família Dr facilitam a colonização ascendente e infecção intersticial no trato urinário e resultam em um aumento no risco de ITU recorrente ou na persistência bacteriana no trato urinário (Nowicki *et al*, 2001).

A adesina fimbrial F1845, originalmente clonada de um isolado de *E.coli* de diarreia, demonstrou similaridade entre o operon gênico e produtos similares à adesina Dr, e também o mesmo receptor (DAF), sendo denominada adesina Daa (diffuse-adhering adhesin) devido a um padrão de adesão difusa demonstrado pela *E.coli*. A adesão provoca lesões nos microvilos das células epiteliais intestinais (Nowicki *et al*, 1990).

Já a adesina afimbrial Afa é codificada pelo operon *afa*, sendo expressa pelas linhagens de *E. coli* uropatogênicas e pertencendo à família de hemaglutininas resistentes a manose (HMR), que também reconhecem o antígeno DAF (Nowicki *et al*, 1990).

O operon *afa* possui uma organização genética similar àqueles outros membros da família da adesina Dr e consistem de pelo menos cinco genes envolvidos na biogênese da adesina: *afaB* (chaperona), *afaC* (âncora), *afaD* (invasina), *afaF* e *afaA* (elementos regulatórios da transcrição) e *afaE* (adesina). Análise por hibridização demonstrou que os blocos gênicos relacionados ao segmento *afaB*, *C* e *D* eram altamente conservados, enquanto o gene *afaE*, possui seqüências heterogêneas, sendo proposto adesinas variáveis, como AfaE I a AfaE VI (Garcia *et al*, 2000). A adesina AfaE-I predomina em casos de diarreia, sepse, pielonefrite e cistite, enquanto a adesina AfaE-III e AfaE-V predominam em casos de cistite (Selvarangan *et al*, 2000; Lalioui & Le Bouguénec 2001; Le Bouguénec *et al*, 2001).

Recentemente, foram identificadas e clonadas duas novas variantes: Afa-VII e Afa-VIII. Estas novas variantes são prevalentes em linhagens de *E.coli* de suínos e bovinos. Embora possuam uma organização genética similar ao operon *afa* de isolados humanos, o teste de PCR foi negativo. Além disso, as adesinas AfaE-VII e AfaE-VIII não reconhecem DAF, sendo seu receptor ainda desconhecido (Le Bouguénec *et al*, 2001).

Estudos epidemiológicos demonstraram uma alta prevalência de genes *afa-VIII* nos isolados de animais e humanos com infecções extraintestinais. Esta variante está relacionada com septicemia neonatal e diarreia em animais, principalmente bezerros, e associados à pielonefrite e septicemia em humanos (Le Bouguénec *et al*, 2001). Em isolados humanos extraintestinais foram detectados *afaE-VIII* e a toxina CNF-1, associados

com pielonefrite e bacteremia. Em contraste, não foi detectado o subtipo AfaE-VII em linhagens patogênicas para o homem (Le Bouguénec *et al*, 2001).

O gene *afaD* é um gene estruturalmente conservado, que expressa uma proteína invasina (AfaD), não está relacionado com o subtipo da adesina (AfaE) ou com uma doença específica. A habilidade de invadir células epiteliais pode estar envolvida em uma estratégia de persistência dentro do hospedeiro, prevenindo uma interação deletéria com a barreira de defesa do hospedeiro. A invasão mediada por Afa-D é dependente do passo inicial de adesão (Garcia *et al*, 2000; Selvarangan *et al*, 2000).

3.2: Toxinas

Com *E.coli* uropatogênicas estão associadas as toxinas α -hemolisina (Hly) e o Fator Necrosante Citotóxico do Tipo 1 (CNF1) (Blum *et al*, 1995; Blanco *et al*, 1997 a; Boquet, 2001). Recentemente, um estudo epidemiológico detectou a presença da Toxina Citoletal Distensora (CDT) em amostras de UPEC (Tóth *et al*, 2003).

3.2.1: Hemolisina

As cepas hemolíticas de *E.coli* produzem a toxina α -hemolisina (α -hly), que é considerada um importante fator de virulência. Além da capacidade de lisar eritrócitos, pode ser citotóxica e destruir leucócitos, granulócitos, fibroblastos, células uroepiteliais, sendo então, apropriadamente denominada citolisina. (Blum *et al*, 1995; Island *et al*, 1998).

A análise molecular dos determinantes genotípicos que codificam esta toxina citolítica em outras espécies bacterianas revelou que α -hly de *E.coli* é um membro da família relacionada a hemolisinas e leucotoxinas, disseminada em bactérias gram-negativas.

Todas estas toxinas da família RTX (Repeat Toxin) são secretadas de suas células por um sistema de transporte altamente conservado (Ludwig & Goebel, 1997).

Em 1903, Kayser descreveu a atividade hemolítica extracelular em linhagens de *E.coli*. Em seguida, estudos identificaram a associação entre a produção de α -hly e a virulência em linhagens de *E.coli* que ocasionam infecções extra-intestinais em humanos, particularmente no trato urinário, peritonite, apendicite, septicemia e meningite neonatal.

Estudo tem sugerido que a lise de eritrócitos pode estimular o crescimento bacteriano no organismo infectado pelo aumento no nível de ferro disponível para o microrganismo. De fato, α -hly lisa eficientemente eritrócitos somente em concentrações relativamente altas. Em concentrações baixas da toxina, seu efeito citotóxico, como a formação de poros na membrana citoplasmática seguida pela depleção rápida e irreversível de ATP celular, acaba atuando em leucócitos, monócitos, linfócitos T periféricos, providenciando um mecanismo de resistência contra o sistema imune (Ludwig & Goebel, 1997). Estudo realizado em células endoteliais, fibroblastos de camundongo e células epiteliais do túbulo renal proximal, resultaram na observação do efeito citotóxico e citolítico da α -hly. Em modelo experimental de pielonefrite, a produção de α -hly tem sido correlacionada com danos no parênquima renal de camundongos (Ludwig & Goebel, 1997).

A atividade hemolítica não está restrita somente à lise e morte celular. Em concentrações baixas, não-líticas, esta toxina pode modular funções normais de diversos tipos celulares, desta forma aumentando a probabilidade da bactéria estabelecer e manter uma infecção. A toxina hemolítica pode atuar aumentando a permeabilidade da membrana de granulócitos polimorfonucleares, resultando na exocitose granular e perda da atividade fagocítica (Ludwig & Goebel, 1997).

Smith & Halls (1967) foram os primeiros pesquisadores a observar que os determinantes genotípicos da toxina hemolítica poderiam ser plasmidiais. Posteriormente, estudos demonstraram que o determinante da α -hly em linhagens de *E.coli* de origem fecal estava localizada em plasmídeos grandes e conjugativos. Entretanto, em linhagens isoladas de ITU, outras infecções extra-intestinais e em fezes de humanos sadios, os genes estavam localizados nos cromossomos.

Os determinantes genotípicos responsáveis pela síntese e secreção da α -hly ativa consistem em quatro genes estruturais arranjados na sequência HlyC, HlyA, HlyB e HlyD. O operon *hlyCABD* codifica a proteína estrutural HlyA (107kDa), a proteína HlyC, responsável pelo processo de ativação pós-transcricional da proteína estrutural, e proteínas HlyB e HlyD, envolvidas no seu processamento e exportação através de ambas as membranas da *E.coli* (Ludwig & Goebel, 1997).

A α -hly é diretamente secretada, sem acúmulo no espaço periplasmático. Este processo é independente de um peptídeo sinal, estando ausente qualquer sequência sinal de transporte convencional na região amino-terminal da proteína HlyA. As proteínas HlyB, HlyD e TolC são essenciais para o transporte da α -hly junto ao seu alvo. HlyB e HlyD estão localizadas na membrana interna da *E.coli*, enquanto TolC, proteína de membrana externa, codificada por um gene cromossômico localizado fora do operon da α -hly, participa da formação de canais permeáveis a íons em membranas lipídicas experimentais, sugerindo que a proteína TolC, atua *in vivo* como um canal na membrana externa. Uma vez secretada, a proteína hemolítica não requer receptor para ligar-se na célula alvo. Hly insere na membrana e forma poros que permitem o fluxo livre de cátions, íons, água, levando a perda do conteúdo intracelular, afetando o citoesqueleto e metabolismo celular (Island *et al*, 1998; Ludwig & Goebel, 1997).

UPEC hemolíticas geralmente expressam fimbria P, sendo associadas aos sorogrupos O4, O6 e O18 e com os antígenos capsulares K2, K5, K12 e K13. Cepas hemolíticas também encontram-se associadas com a toxina CNF1 em uma região particular no cromossomo chamada PAI II, na linhagem uropatogênica de laboratório *E.coli* J36 e, geralmente, estas toxinas estão associadas com a fimbria P (Island *et al*, 1998; Boquet 2001). Estudos epidemiológicos demonstraram que devido a associação entre α -hly e a fimbria P, a produção de Hly é mais comum entre linhagens de pacientes com pielonefrite, sendo progressivamente menos comum em cistite, bacteremia assintomática e linhagens fecais (Ludwig & Goebel, 1997).

3.2.2: Fator Necrozante Citotóxico do tipo 1 (CNF-1)

CNF-1 foi descrita por Caprioli *et al* (1983) como uma toxina capaz de induzir a reorganização dos microfilamentos de actina celular em células eucarióticas. Posteriormente, Fiorentini *et al* (1988) demonstraram que a ativação de proteínas RhoGTPases por CNF-1 induziam a reorganização do citoesqueleto de actina. Embora tenha sido originalmente identificada em linhagens de *E.coli* de pacientes com enterite, esta toxina não foi demonstrada como o principal fator na patogênese de diarreia. Estudos epidemiológicos demonstraram que a toxina CNF-1 estava associada a isolados de infecções extraintestinais, sendo encontrada principalmente em UPEC, particularmente comum nos sorogrupos O2, O6 e O75.

CNF-1 foi primeiramente descrita como uma toxina que ocasiona necrose na pele de coelhos quando inoculada intradermicamente e é letal quando injetada intraperitonealmente. Estudos *in vitro* demonstraram uma profunda reorganização do citoesqueleto formado por actina, extensa multinucleação e alongamento em células HeLa,

formação de grandes vacúolos em células HEp-2, morte de células 5637 de bexiga através de um mecanismo apoptótico (Mills *et al*, 2000; Rippere-Lampe *et al*, 2001). O efeito desta toxina tem sido relacionado com a passagem bacteriana através das células endoteliais em casos de meningite e têm sido encontradas em linhagens de *E.coli* K1 envolvidas em meningite neonatal. Além disso, foi observado a diminuição da transmigração de polimorfonucleares e o desencadeamento da internalização de esferas revestidas de látex e de bactérias não-invasivas (Island *et al*, 1998; Boquet, 2001).

Em UPEC, CNF-1 é codificada por um gene de 3042 pb, presente no cromossomo, produzindo uma proteína de 108 kDa. Diferentemente da Hly, CNF-1 não pertence a um operon, que codifica tanto o gene estrutural quanto o aparato de secreção, e seu mecanismo de secreção ainda não foi elucidado. A maioria de UPEC produzindo CNF-1 contém na mesma PAI o operon *hly*, logo, é proposto que estas duas toxinas podem atuar conjuntamente em um mecanismo de virulência, provavelmente oferecendo vantagens para a bactéria (Blum *et al*, 1995; Boquet, 2001). Island *et al* (1998) sugerem que CNF-1 pode influenciar a ação da Hly, possivelmente pelo desencadeamento da internalização ou associação da UPEC com células da bexiga, aumentando desta forma, a efetividade da hemolisina. Porém, os resultados obtidos através da utilização de isolados CNF1⁻, indicaram que a toxina CNF-1 não altera a capacidade citolítica *in vitro* de isolados hemolíticos de cistite em células T24 de bexiga (Island *et al*, 1998).

Estudos utilizando camundongos como modelo experimental para ITU ascendente, demonstraram que CNF-1 pode participar da patogênese de ITU, uma vez que foi encontrado um predomínio de linhagens CNF-1⁺ na bexiga e urina destes camundongos no início da infecção, comparando com animais inoculados com o respectivo mutante isogênico, cujo gene *cnf-1* foi deletado. Também foi demonstrado que CNF-1 pode alterar a

resposta da infecção, auxiliando a penetração bacteriana junto à parede muscular da bexiga, ocasionando uma infecção mais severa e prolongada (Rippere-Lampe *et al*, 2001).

3.2.3-Toxina Citoletal Distensora (CDT)

CDT é uma citotoxina termolábil recentemente descrita por Johnson & Lior (1987) produzida por enteropatógenos causadores de diarreia. Entre as bactérias produtoras de CDT estão alguns isolados de *Escherichia coli* enterotoxigênicas, enteropatogênicas e enteroagregativas (Johnson & Lior, 1988b). Filtrados de cultura bacteriana de linhagens produtoras de CDT causam distensão celular progressiva e finalmente morte em algumas linhagens celulares de laboratório, incluindo células de ovário de Hamster chinês (CHO), células de rim de macaco verde africano (Vero), célula HeLa e células de epiteloma de laringe humana (HEp-2) (Johnson & Lior, 1987; Johnson & Lior, 1988a; Johnson & Lior, 1988b).

Os genes caracterizados para CDT, incluem aqueles produzidos por isolados clínicos de *Escherichia coli* (Pickett *et al.*, 1994; Scott & Kaper, 1994), *Campylobacter jejuni* (Pickett *et al.*, 1996) e *Shigella dysenteriae* tipo 2 (Okuda *et al.*, 1995). Baseado nesses relatos, a CDT é codificada por três genes, designados *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* que estão arrançados em um operon. Estes três genes especificam polipeptídeos com peso molecular de aproximadamente 25 a 35 kDa (*cdtA*), 28 a 30 kDa (*cdtB*) e 20 a 21kDa (*cdtC*) (Pickett *et al.*, 1994; Scott & Kaper, 1994; Okuda *et al.*, 1995). Evidências decorrentes desses estudos sugerem que todos os três polipeptídeos são necessários para a toxicidade (Pickett *et al.*, 1994; Scott & Kaper, 1994; Okuda *et al.*, 1995); no entanto, a natureza e composição da holotoxina e o arranjo de suas sub-unidades ainda são desconhecidos.

Elwell & Dreyfus (2000) e Lara-Tejero & Galán (2000), relataram que CdtB exibe similaridade na sequência de aminoácidos com DNase I. Elwell *et al.* (2001) mostraram que, quando inserida em células HeLa por eletroporação, CdtB de *E. coli* era capaz de desencadear a parada do ciclo celular na fase G2/M. O mesmo já havia sido relatado por Shenker *et al.* (1999) em *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e por Lara-Tejero & Galán (2000) em *Campylobacter jejuni*. Por outro lado, estudos realizados por Purvén *et al.* (1997) indicaram que CdtC de *Hemophilus ducreyi* era capaz de induzir efeitos tóxicos.

Lara-Tejero & Galán (2001) mostraram que CdtA, CdtB e CdtC de *C. jejuni* formavam um complexo tripartite e propuseram que a holotoxina de CDT de *C. jejuni* seria composta de CdtB como sub-unidade A enzimaticamente ativa e de uma sub-unidade B heterodimérica composta por CdtA e CdtC.

Estudos epidemiológicos moleculares estão sendo realizados para a detecção de genes de CDT em *E. coli* extraintestinal proveniente tanto de origem animal quanto humana. Este fator de virulência tem sido encontrado em isolados extraintestinais, porém a frequência de ExPEC *cdt*⁺ não é alta. Tóth *et al* (2003) detectaram 15 (7,9%) isolados *cdt*⁺ em uma coleção de 190 amostras de UPEC. Johnson & Stell (2000) detectaram o gene *cdtB* em 8% das linhagens isoladas de urosepsis, enquanto um estudo realizado por Johnson *et al* (2002), detectou o gene *cdtB* em 46% das linhagens isoladas de crianças com meningite. Estes achados demonstram que a produção de CDT não é limitada a linhagens encontradas em síndromes diarreio gênicas.

3.3: Cápsula

Antígenos capsulares são polímeros de monossacarídeos repetidos, podendo ter componentes lipídicos ou aminoácidos em sua estrutura regular, que conferem evasão às bactérias contra a defesa do hospedeiro e potencia a infecção *in vivo* (Jann & Jann, 1997). A maioria dos isolados uropatogênicos possui cápsula do grupo II (K1, K4, K5, K7, K12 e K92), caracterizadas pela expressão a 25°C pelos componentes ácidos em sua estrutura, e por serem cromossomicamente determinadas pelo operon *kps* (Jann & Jann, 1997).

Cápsula K1 (pertencente ao grupo II), tem característica anti-fagocítica, por ser carregada negativamente e por bloquear ativação da via alternativa do complemento, reduzindo a opsonização. A presença de K1 é mais comum em meningite e septicemia neonatal e parece contribuir para o desenvolvimento de pielonefrites do que outros tipos de ITU (Bliss & Silver, 1996; Jan & Jan, 1997; Russo *et al*, 1998).

Particularmente K1 e K5 foram clonadas e extensivamente estudadas, demonstrando uma organização comum de três regiões funcionais. Na região 2 são encontrados os genes que participam da biossíntese de ácido polisiálico, responsável pelo sorotipo específico de K. Esta região é flanqueada pelas regiões 1 e 3 que são altamente conservadas. A região 1 contém seis genes (*kpsFEDUCS*) e a região 3 contém dois genes (*kpsMT*), cujos produtos são requeridos para o transporte do polissacarídeo capsular através da membrana citoplasmática e montagem junto à superfície celular bacteriana (Bliss & Silver 1996; Russo *et al*, 1998).

Johnson & Stell (2000), pesquisando isolados provenientes de pacientes com urosepsis, relataram a associação entre os fatores de virulência: cápsula, o alelo *papGII* e aerobactina, como também foi observada a associação positiva entre os genes *kpsMTIII* e *hlyA*.

3.4: Aerobactina

A virulência da *E.coli* patogênica é dependente da sua habilidade de multiplicar e sobreviver no tecido do hospedeiro. Para isso, o crescimento bacteriano depende de nutrientes essenciais, como o ferro. A quantidade livre de ferro no homem é limitada, sendo predominantemente encontrado intracelularmente nas proteínas heme, enquanto pequenas quantidades de ferro extracelular são retiradas por proteínas ligantes de ferro (Griffiths, 1997; Thariath *et al*, 1993; Torres *et al*, 2001; Purdy & Payne, 2001, Russo *et al*, 2002).

E.coli patogênica possui vários mecanismos envolvidos para adquirir ferro, sendo que um deles é a síntese e transporte de sideróforos, quelantes de ferro. Aerobactina, um sideróforo hidroxamato, é produzida em condições de detrimento de ferro encontrado no fluido corpóreo (complexados às proteínas hemoglobina, transferrina e lactoferrina) e no tecido de vertebrados. É um componente importante na virulência de linhagens de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, ocasionando infecções extraintestinais em humanos e animais domésticos pela habilidade de captar ferro da transferrina (Thariath, *et al*, 1993).

Outro mecanismo para aquisição de ferro é a utilização direta dos compostos férricos do hospedeiro, particularmente da proteína heme. O transporte de ferro associado com sideróforos, ou o requerimento de receptores de membrana específicos para o grupamento heme, dependem da proteína TonB e proteínas acessórias ExbB e ExbD (Braun, 1995; Torres *et al*, 2001). TonB está ancorada na membrana citoplasmática, providenciando energia para os receptores de membrana externa, associados ao transporte de compostos férricos. A contribuição deste sistema de transporte de ferro associado à

proteína TonB na virulência, tem sido demonstrada em muitos patógenos gram-negativos. Estudos utilizando mutantes *tonB*⁻ verificaram que a atividade patogênica e aquisição de ferro nestas linhagens ainda permaneceram mesmo após a depleção de TonB, pois a bactéria utilizava uma via alternativa para adquirir ferro (Torres *et al*, 2001).

Os genes que codificam o sistema de captação de ferro aerobactina podem ser plasmidiais ou cromossômicos. O operon da aerobactina (*iuc*) compreende cinco genes *iucABCD* e *iutA*. Quatro destes (*iucABCD*) estão envolvidos na biossíntese do sideróforo, enquanto *iutA* codifica o receptor de membrana externa ferroaerobactina. O gene *iucD* codifica uma oxigenase que catalisa a conversão da L-lisina em N⁶-Hidroxilase, que cataliza o passo inicial da biossíntese da aerobactina. (Thariath *et al*, 1993).

Estudos epidemiológicos verificaram que em UPEC provenientes de cistite, o sistema de captação de ferro estava associado à expressão da fimbria P (Jacobson *et al*, 1988). Enquanto Orskov *et al* (1988) encontraram a associação da aerobactina com a fimbria P e a toxina hemolítica, os genes *papC*⁺, *hly*⁺ e *kps*⁺, são descritos na literatura em associação com a aerobactina (Orskov *et al*, 1988; Griffiths, 1997). Já Bindgen-Bindois *et al* (2002), associam a presença da aerobactina com o alelo *papGII*.

Foi verificado que em linhagens onde o gene da aerobactina era plasmidial, muitas vezes também haviam genes associados à resistência antimicrobiana. Estudos realizados em linhagens provenientes de urosepsis, observaram que os genes da aerobactina eram mais comuns em linhagens de pacientes comprometidos, do que de hospedeiros não-comprometidos, possivelmente porque os hospedeiros comprometidos são sujeitos a uma exposição maior aos agentes antimicrobianos (Johnson *et al*, 1988).

3.5: Proteína específica Uropatogênica

Em 2000, Kurazono *et al* identificaram uma nova proteína associada a linhagens de UPEC. Esta proteína foi detectada da linhagem de *E.coli* Z42, isolada de um paciente com prostratite. Na procura por um gene homólogo à toxina zot (zonula occludens toxin) encontrada em *Vibrio cholerae*, foi identificada uma possível ilha de patogenicidade, associada com UPEC. Esta PAI contém o gene *usp* que codifica uma proteína de 346 aminoácidos, que foi designada “Uropathogenic-Specific Protein (USP), e três “open reading frames (ORFs; *orfUI-3*) de 98, 97 e 96 aminoácidos respectivamente. USP é significativamente detectada em linhagens de UPEC, do que em linhagens fecais de indivíduos sadios, sendo encontradas em todos os sorogrupos comuns de UPEC. Foi demonstrado, recentemente, que *usp* aumenta a infectividade da *E.coli*, enquanto *orfsUI-3* falharam por exibir este efeito em modelo de infecção no trato urinário de camundongo (Nakano *et al*, 2001).

Em estudo conduzido no Japão, o gene *usp* foi detectado em 24% das 50 amostras de *E.coli* de indivíduos sadios, em 80% dos 195 isolados de cistite e em 93% dos 73 isolados de pielonefrite (Kurazono *et al*, 2000). Já o estudo realizado por Bauer *et al* (2002), evidenciou que o gene *usp* foi encontrado em menor frequência nos isolados de ITU, do que naquela coleção estudada no Japão, e que o resultado obtido não caracteriza a associação da proteína *usp* com ITU.

Em trabalho realizado por Parret & De Mot (2002), foi descoberto que a proteína USP tem homologia relativa às piocinas do tipo S. Piocinas são produzidas por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, pertencendo a um grande grupo heterogêneo de proteínas conhecidas como bacteriocinas. Piocinas são bacteriocinas cromossomicamente codificadas, demonstrando características funcionais e estruturais com um subgrupo de

bacteriocinas de *E.coli* (colicinas nuclease). É sugerido que a proteína USP atue como uma bacteriocina, contra a competição de linhagens de *E.coli* que ocupam o mesmo nicho, aumentando desta forma sua infectividade no trato urinário (Parret & De Mot, 2002).

Neste trabalho foram detectados os fatores de virulência, previamente descritos na literatura, presentes em cepas de UPEC provenientes de pacientes apresentando quadro clínico de cistite. Para estudar estas amostras de *E.coli* foi proposto a caracterização genotípica dos fatores de virulência através da reação da polimerase em cadeia (PCR) que tem se demonstrado como um método sensível e específico. Os resultados obtidos através deste estudo com amostras de UPEC podem auxiliar na definição da prevalência e associações entre os fatores de virulência e o hospedeiro, promovendo um estudo epidemiológico, assim como estimativas do significado clínico destes fatores de virulência envolvidos na cistite.

II- OBJETIVOS:

Este trabalho teve por objetivo a caracterização genotípica de 162 amostras de *Escherichia coli* (UPEC) isoladas de pacientes apresentando sinais clínicos de cistite. Para tal buscou-se:

- 1- Verificar a presença dos genes codificadores para os fatores de colonização: fimbria do tipo 1 (*fimH*), fimbria P (*papC*, *papG*, *papE/F*), fimbria S (*sfa*) e adesina afimbrial (*afa*), através da reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando iniciadores específicos;
- 2- Verificar através da PCR, a presença dos genes para os fatores de virulência associados a UPEC previamente descritos na literatura, tais como as toxinas *cnf-1*, *hly* e *cdt*, o sideróforo aerobactina (*iucD*), cápsula (*kpsMTIII*) e a proteína uropatogênica específica (*usp*), recentemente identificada.
- 3- Verificar a associação de genes para os fatores de virulência estudados, presentes em cada uma das amostras.

III- MATERIAL E MÉTODOS:

1-Amostras bacterianas:

Foram utilizadas 162 amostras de *Escherichia coli*, isoladas de pacientes apresentando quadro clínico de cistite. Estas amostras foram doadas pelo Prof. Dr Ulysses Moraes de Oliveira, do Departamento de Patologia Clínica/FCM-UNICAMP.

Como controle positivo foram utilizadas as amostras FVL2 (O4:K12:H1, *sfa*, *pap*, *iucD*, *hly*, *cnf-1*), FVL16 (O6:K13:H1, *cnf-1*, *hly*, *pap*, *sfa*), FV35 (*afa*, *iucD*, *cnf-1*), FVL8 (O4:K12:H5, *sfa*, *pap*, *papGII*, *hly*, *iucD*, *usp*, *cnf1*), J96 (*papGI* e *papGIII*), ORN 115 (*fimH*), U9-41 (O2:K1:H4, *kpsMTII*), CLDT7(2) (*cdt*). Como controle negativo foi utilizada a amostra DH5 α . Todas as amostras pertencem à bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia/IB-UNICAMP.

2-Obtenção de DNA para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

A obtenção de DNA foi realizada de acordo com o método descrito por Blanco *et al*, 1997b. As amostras foram cultivadas em Infuso cérebro e coração (BHI) a 37°C por 24 horas. Após este procedimento, foram repicadas em ágar TSA a 37°C por 24h para obtenção de crescimento confluyente. Em seguida, um raspado de cada uma das amostras foi ressuspensionado em 100 μ L de água deionizada estéril. A suspensão bacteriana obtida foi fervida por 10 minutos e centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos. Os sobrenadantes destes materiais foram utilizados para a reação de PCR.

3-Reação da Polimerase em Cadeia (PCR):

A reação de PCR foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para cada um dos genes já descritos na literatura: *papC* (proteína de membrana externa da fimbria P), *papE/F* (subunidades menores da fimbria P), *papGI/GII/GIII* (alelos da adesina papG), *fimH* (adesina da fimbria do tipo1), *afaB/C* (região conservada chaperona-âncora), *sfaD/E* (região conservada *sfa/foc*), *cnf-1* (fator necrozante citotóxico do tipo1), *hlyA* (proteína estrutural hemolítica), *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina), *kpsMTII* (montagem do grupo II capsular-K1,K5), *usp* (proteína específica uropatogênica), *cdtB* (toxina citolética distensora). A sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e peso molecular estão especificadas na Tabela 3.

Tabela 1: Para as reações de PCR dos genes *afa*, *fimH*, *cnf-1/sfa*, *usp* e *cdt* foram utilizados:

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
Água deionizada estéril (qsp)	30	_____
10X "PCR Buffer" (Biotools)	3	1X
10mM "dNTP mixture" (Biotools)	0,6	0,2 mM cada
Iniciador 1	_____	Tabela 1
Iniciador 2	_____	Tabela 1
50 mM MgCl ₂ (Biotools)	1,2	2,0mM
DNA extraído	7	_____
"Taq-DNA Polimerase" (1U) (Biotools)	1	1,0 U
TOTAL	30	_____

As soluções foram pré-aquecidas a 94°C/10' e submetidas a 30 ciclos de: 94°C/1', temperatura de anelamento de 76°C/1' para *afa*, 66°C/1' para *usp*, 63°C/1' para *sfa/cnf-1*, *fimH*, e 50°C/1' para *cdtB*, temperatura de extensão de 72°C/2' e, em seguida, a 72°C/7'.

Reações de multiplex foram padronizadas isoladamente e posteriormente agrupadas de acordo com o peso molecular: Multiplex A para os iniciadores *papC*, *papGI*, *papGII*, *papGIII* e multiplex B para *kps*, *papE/F*, *iucD*, *hly*.

Tabela 2: Para as reações de PCR multiplex foram utilizados:

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
Água deionizada estéril (qsp)	25	_____
10X "PCR Buffer" (Biotools)	2,5	1X
10mM "dNTP mixture" (Biotools)	1,2	0,4 mM cada
Iniciador 1	_____	Tabela 1
Iniciador 2	_____	Tabela 1
50 mM MgCl ₂ (Biotools)	2,4	4 mM
DNA extraído	2	_____
"Taq-DNA Polimerase" (1U) (Biotools)	1,5	1,5 U
TOTAL	25	_____

As soluções foram pré-aquecidas a 94°C/10' e submetidas a 25 ciclos de: 94°C/30'', temperatura de anelamento de 63°C/1', temperatura de extensão de 68°C/3' e, em seguida, a 72°C/7'.

4- Eletroforese em Gel de Agarose:

Para a leitura do resultado das amplificações, 5µL do tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 25% de ficoll) foi misturado no produto da reação. Foram aplicados 10µL 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 pH 8 (T.A.E). A identificação da banda foi feita mediante incubação em solução de brometo de etídio (1,5µg/mL) por 15' e visualizada em transiluminador de luz UV. Para registro, os géis foram fotografados através do sistema ImageMaster VDS (Amersham Pharmacia Biotech Inc. EUA).

Tabela 3: Iniciadores usados nas reações de PCR.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5' → 3')	Produto amplificado (pb)	Quantidade iniciadores por reação (ng/μL)	Referência	TA* (°C)
<i>cnfI</i>	CNF1: GAA CTT ATT AAG GAT AGT CNF2: CAT TAT TTA TAA CGC TG	543	90	Blanco <i>et al</i> ; 1997b	63
<i>hlyA</i>	1: AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T 2: ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	1.177	60	Yamamoto <i>et al</i> ; 1995	63
<i>papC</i>	1: GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G 2: ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	328	60	Daigle, <i>et al</i> ; 1994	63
<i>papE/F</i>	1: GCA ACA GCA ACG CTG GTT GCA TCA T 2: AGA GAG AGC CAC TCT TAT ACG GAC A	336	60	Yamamoto <i>et al</i> ; 1995	63
<i>pap G</i> <i>classe I</i>	1: CAA CCT GCT CTC AAT CTT TAC TG 2: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT	692	60	Karkkainen <i>et al</i> ; 1998	63
<i>pap G</i> <i>classe II</i>	1: GGA ATG TGG TGA TTA CTC AAA GG 2: TCC AGA GAC TGT TCA AGA AGG AC	562	60	Karkkainen <i>et al</i> ; 1998	63
<i>papG</i> <i>Classe III</i>	PG1: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT PG2: TCC AGA GAC TGT GCA GAA GGA C	421	60	Karkkainen <i>et al</i> ; 1998	63
<i>fimH</i>	A: TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG B: GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA	508	60	Johnson & Stell, 2000	63
<i>afaB/C</i>	1: GCT GGG CAG CAA ACT GAT AAC TCT C 2: CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCC G	750	60	Yamamoto <i>et al</i> ; 1995	76
<i>sfaD/E</i>	1: CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A 2: CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	410	90	Daigle <i>et al</i> ; 1994	63
<i>iucD</i>	A: TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T B: AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G	602	60	Yamamoto <i>et al</i> ; 1995	63
<i>cdt B</i>	A: TAT GAT AGC CTC TTT TAT CGT CGT CTG B: AGA GGA GAG TTA GAG CCT ATG ATA GCC TCT	805	60	Silva e Leite; 2002	50
<i>usp</i>	A: ATG CTA CTG TTT CCG GGT AGT GTG T B: CAT CAT GTA GTC GGG GCG TAA CAA T	1000	60	Nakano <i>et al</i> , 2001	66
<i>kpsMTII</i>	A: GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG B: CAT CAG ACG ATA AGC ATG AGC A	272	60	Johnson & Stell, 2000	63

*TA: Temperatura de anelamento

IV-RESULTADOS

Os ensaios de polimerização em cadeia permitiram a caracterização genotípica das 162 amostras de *E.coli* isoladas de pacientes apresentando quadro clínico de cistite. Identificamos que 154 amostras apresentaram o gene *fimH* (95,1%), 86 amostras o gene *kpsMTIII* (53,1%), 53 amostras o gene *papC* (32,7%), 45 amostras o gene *sfa* (27,7%), 42 amostras o gene *iucD* (25,9%), 41 amostras o gene *hly* (25,3%), 36 amostras o gene *usp* (22,2%) e 30 amostras apresentaram o gene da toxina CNF-1 (18,5%). Nenhuma amostra foi positiva para o gene *cdtB* e para o gene *papGI* (Tabela 4).

Em 76 amostras (49,35%) foi detectada a presença de dois ou mais genes associados a diferentes estruturas fimbriais. Quatro amostras (2,5%) foram negativas para todos os genes dos fatores de virulência pesquisados.

Através dos resultados da PCR foi possível verificar associações entre os fatores de virulência pesquisados neste trabalho. Em outras palavras, foi possível verificar quais genes, para os fatores de virulência estudados, estavam presentes em cada uma das amostras analisadas (Tabela 5 a 9). Assim, os genes para as diferentes fimbrias encontradas em UPEC, já descritas na literatura foram estudadas, sendo posteriormente verificada a possível associação entre estes genes fimbriais e com os outros fatores de virulência associados a infecções no trato urinário, como toxinas e a proteína uropatogênica (USP), recentemente descoberta. Os genes *papC*, *sfa*, *afa* e *usp* foram tomados para análise, conforme mostram as tabelas 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

O gene para a adesina da fimbria do tipo 1 (*fimH*) foi detectado em 154 amostras. Em 78 amostras foi encontrado apenas o gene *fimH*, estando ausente quaisquer outros genes para estruturas fimbriais. Destas 78 amostras, 50 amostras possuíam apenas o gene para a adesina *fimH*, enquanto que em 28 amostras foi detectada a presença de um ou mais dos

genes estudados para fatores de virulência não associados a fimbrias (Tabela 5). Dentre as 154 amostras *fimH*⁺, 83 amostras eram *kps*⁺ (53,9%), 40 amostras *iucD*⁺ (26,0%), 40 amostras *hly*⁺ (26,0%), 35 amostras *usp*⁺ (22,7%) e 30 amostras *cnf-I*⁺ (19,5%). (Dados não apresentados em tabelas, em termos de porcentagem %).

O gene *papC*, que quando expresso codifica uma proteína de membrana externa da fimbria P, foi detectado em 53 amostras (32,7%). Dentre as 53 amostras *papC*, foram obtidas 45 amostras *kps*⁺ (84,9%), 31 amostras *hly*⁺ (58,5%), 23 amostras *iucD*⁺ (43,4%) e 16 amostras *cnf-I*⁺ (30,2%). Estes resultados estão expressos na Tabela 6.

Em todas as 53 amostras *papC*, foram detectados genes para os diferentes alelos da adesina *papG*, sendo assim distribuídos: 29 amostras *papGII*⁺, 23 amostras *papGIII*⁺ e apenas uma amostra *papGII/papGIII*⁺. Nenhuma amostra *papGI* foi detectada, uma vez que este alelo é encontrado em amostras isoladas de fezes.

Ambos os alelos *papG* foram encontrados em associação com o gene da toxina hemolítica, sendo identificadas 12 amostras *papGII*⁺*hly*⁺ e 18 amostras *papGIII*⁺*hly*⁺, enquanto o gene para a toxina *cnf-I* foi identificado em 15 amostras *papGIII*⁺ e em apenas uma amostra *papGII*⁺*cnf-I*⁺ (Tabela 6).

O gene *papGII* foi encontrado em amostras em que estavam presentes os genes *kps*, *iucD*, *hly* associados ou não, enquanto o alelo *papGIII* foi detectado em amostras cujos genes *kps*, *hly* e *cnf-I* estavam presentes isoladamente ou em suas possíveis associações (Tabela 6).

O gene *sfaD/E*, responsável pela expressão de uma região conservada (chaperona) da fimbria S, foi detectado em 45 amostras, sendo que em 28 amostras *sfa*⁺ estava também presente o gene para o alelo *papG*, assim distribuído: 12 amostras *papGII*⁺ e 16 amostras *papGIII*⁺. Além disso, 38 amostras *sfa*⁺ (84,4%) foram amplificadas para o gene *kpsMTII*

(cápsula) e 16 amostras *iucD*⁺ (35,6%). O gene *sfaD/E* foi encontrado em associação com as toxinas pesquisadas, sendo encontradas 12 amostras *sfa*⁺*hly*⁺, 14 *sfa*⁺*cnf-I*⁺ e 13 *sfa*⁺*hly*⁺*cnf-I*⁺ (Tabela 7).

Já o gene *afaB/C*, que quando expresso codifica uma região conservada (âncora-chaperona) da adesina afimbrial, foi detectado em 10 amostras (6,2%). Em todas as amostras *afa*⁺ foi detectado o gene para adesina da fimbria do tipo 1 (*fimH*), sendo que sete amostras eram *fimH*⁺*afa*⁺, uma amostra era *fimH*⁺*sfa*⁺*afa*⁺ e duas amostras *fimH*⁺*papC*⁺*papGII*⁺*afa*⁺. Em seis amostras foi detectado o gene *kps* (cápsula) e em quatro amostras o gene *iucD* (aerobactina) (Tabela 8).

O gene *iucD* foi detectado em 42 (25,9%) das amostras estudadas. Este gene foi encontrado em 23 amostras positivas para os genes da fimbria P estudados (*papC* *papG* *papEF*), sendo assim distribuídos, de acordo com os diferentes alelos da adesina papG: 20 amostras *papGII*⁺ e apenas três amostras *papGIII*⁺ (Tabela 6). Em 16 amostras positivas para o gene *iucD* também foi encontrado o gene *sfa*.

Os genes para os fatores de virulência cápsula, o alelo papGII e aerobactina foram encontrados em 19 amostras *papGII*⁺*kps*⁺*iucD*⁺ e em apenas três amostras *papGIII*⁺*kps*⁺*iucD*⁺.

A proteína uropatogênica específica (USP) foi detectada em 36 amostras (22,2%). O gene *usp* foi detectado em 10 amostras *papGII*⁺ e em 6 amostras o gene *papGIII*⁺, totalizando 16 amostras associadas à fimbria P. O gene *sfa* foi encontrado em 15 amostras *usp*⁺ enquanto em 35 amostras *usp*⁺ foi detectado o gene *fimH* (Tabela 9). O gene *kps* foi amplificado em 25 amostras (69,4%), 15 amostras *usp*⁺ tiveram amplificado o gene *hly* (41,7%), 10 amostras eram *iucD*⁺ (27,8%) e sete amostras *cnf-I*⁺ (19,4%). Estes resultados estão presentes na tabela 9.

Tabela 4: Resultados (número e porcentagem), para a pesquisa de genes de fatores de virulência de *Escherichia coli** isoladas de pacientes com cistite, por reação da polimerase em cadeia (PCR).

Fatores de virulência (Genes)	Número de amostras positivas (%)
<i>fimH</i>	154 (95,1)
<i>kpsMTII</i>	86 (53,1)
<i>papC</i>	53 (32,7)
<i>papGI</i>	0 (0)
<i>papGII</i>	29 (17,9)
<i>papGIII</i>	23 (14,2)
<i>papGII/GIII</i>	1 (0,62)
<i>papE/F</i>	53 (32,7)
<i>sfaD/E</i>	45 (27,8)
<i>iucD</i>	42 (25,9)
<i>hlyA</i>	41 (25,3)
<i>usp</i>	36 (22,2)
<i>cnf-1</i>	30 (18,5)
<i>afaB/C</i>	10 (6,2)
<i>cdtB</i>	0 (0)

*Legenda: *fimH* (adesina fimbrial do tipo1); *kpsMTII* (montagem do grupo II capsular-K1, K5); *papC* (proteína de membrana externa da fimbria P); *papGI/GII/GIII* (alelos da adesina *papG*); *papE/F* (subunidades menores da fimbria P); *sfaD/E* (região conservada *sfa/foc*); *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina); *hlyA* (proteína estrutural hemolítica); *usp* (proteína uropatogênica específica); *cnf-1* (fator necrozante citotóxico do tipo1); *afaB/C* (Região conservada âncora-chaperona); *cdtB* (toxina distensora citoletal).

Tabela 5: Associação de genes para os fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de cistites de humanos, detectados por reações da polimerase em cadeia (PCR), utilizando iniciadores específicos.

Genes	<i>hly</i>	<i>cnf-1</i>	<i>iucD</i>	<i>kps</i>	<i>iucD kps</i>	<i>hly iucD kps</i>	<i>hly cnf-1 kps</i>	<i>hly kps</i>	<i>hly iucD</i>	<i>cnf-1 kps</i>	<i>cnf-1 iucD</i>	<i>iucD cnf-1 kps</i>	<i>hly cnf-1 iucD kps</i>	Negativo	Total
<i>fimH</i>	1		6	14	5			2						50	78
<i>fimH papC/EF/GII</i>				2	7	3								3	15
<i>fimH papC/EF/GIII</i>								3	4						7
<i>fimH papC/EF/GII sfa</i>				1	1	7			1	1				1	12
<i>fimH papC/EF/GIII sfa</i>	1			1	1			7	1	3			2		16
<i>fimH sfa</i>		2		1		1		3		6	1		1		15
<i>sfa</i>	1														1
<i>fimH afa</i>				2	2									3	7
<i>fimH sfa afa</i>												1			1
<i>fimH papC/EF/</i> <i>papGIII afa</i>						1								1	2
<i>fimH papC/EF/GIII/GIII</i>	1														1
Negativo				1	1	1								4	7
Total	4	2	6	22	17	13	13	7	1	10	1	1	3	62	162

Tabela 6: Associação entre o gene da adesina da fimbria P e outros genes dos fatores de virulência em *Escherichia coli* isoladas de cistites de humanos, detectados por reação da polimerase em cadeia (PCR).

Adesina <i>papG</i>	<i>hly</i>	<i>kps</i>	<i>tucD kps</i>	<i>hly tucD kps</i>	<i>hly cnf-1 kps</i>	<i>hly kps</i>	<i>hly tucD</i>	<i>cnf-1 kps</i>	<i>hly cnf-1 tucD kps</i>	Negativo	Total
<i>fimH papGII</i>		2	7	3						3	15
<i>fimH papGII sfa</i>		1	1	7			1	1		1	12
<i>fimH papGII afa</i>				1						1	2
<i>fimH papGIII</i>					3	4					7
<i>fimH papGIII sfa</i>	1	1	1		7	1		3	2		16
<i>fimH papGII/GIII</i>	1										1
Total	2	4	9	11	10	5	1	4	2	5	53

Legenda: *fimH* (adesina fimbrial do tipo1); *kpsMTII* (montagem do grupo II capsular-K1, K5); *papC* (proteína de membrana externa da fimbria P); *papGI/GII/GIII* (alelos da adesina *papG*); *papE/F* (subunidades menores da fimbria P); *sfaD/E* (região conservada *sfa/foc*); *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina); *hlyA* (proteína estrutural hemolítica); *cnf-1* (fator necrozante citotóxico do tipo1); *afaB/C* (Região conservada âncora-chaperona).

Tabela 7: Associação entre o gene *sfa* da fimbria S e outros genes dos fatores de virulência em *Escherichia coli* isoladas de cistites de humanos, detectados por reação da polimerase em cadeia (PCR).

Gene <i>sfa</i>	<i>hly</i>	<i>cnf-1</i>	<i>kps</i>	<i>iucD kps</i>	<i>hly iucD kps</i>	<i>hly cnf-1 kps</i>	<i>hly kps</i>	<i>hly iucD</i>	<i>cnf-1 kps</i>	<i>cnf-1 iucD</i>	<i>cnf-1 iucD kps</i>	<i>hly cnf-1 iucD kps</i>	Negativo	Total
<i>sfa</i>	1													1
<i>fimH sfa</i>		2	1		1	3			6	1		1		15
<i>fimH papC/GII sfa</i>			1	1	7			1	1				1	12
<i>fimH papC/GIII sfa</i>	1		1	1		7	1		3			2		16
<i>fimH afa sfa</i>											1			1
Total	2	2	3	2	8	10	1	1	10	1	1	3	1	45

Legenda: *fimH* (adesina fimbrial do tipo I); *kpsMTII* (montagem do grupo II capsular-K1, K5); *papC* (proteína de membrana externa da fimbria P); *papGI/GII/GIII* (alclos da adesina *papG*); *papE/F* (subunidades menores da fimbria P); *sfaD/E* (região conservada *sfa/foc*); *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina); *hlyA* (proteína estrutural hemolítica); *cnf-1* (fator necrozante citotóxico do tipo I); *afaB/C* (Região conservada âncora-chaperona).

Tabela 8: Associação do gene *afa* da adesina afimbrial e os genes para os fatores de virulência em *Escherichia coli* isoladas de cistites de humanos.

Gene <i>afa</i>	<i>kps</i>	<i>iucD kps</i>	<i>hly iucD kps</i>	<i>iucD cnf-1 kps</i>	Negativo	Total
<i>fimH afa</i>	2	2			3	7
<i>fimH sfa afa</i>				1		1
<i>fimH papC/papGII afa</i>			1		1	2
Total	2	2	1	1	4	10

Legenda: *fimH* (adesina fimbrial do tipo1); *kps*MTII (montagem do grupo II capsular-K1, K5); *papC* (proteína de membrana externa da fimbria P); *papGI/GII/GIII* (alelos da adesina *papG*); *papE/F* (subunidades menores da fimbria P); *sfaD/E* (região conservada *sfa/foc*); *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina); *hlyA* (proteína estrutural hemolítica); *cnf-1*(fator necrozante citotóxico do tipo1); *afaB/C* (Região conservada âncora-chaperona).

Tabela 9: Associações do gene da proteína uropatogênica específica (*usp*) com os fatores de virulência em *Escherichia coli* isoladas de cistites de humanos.

Genes	<i>dsn</i>	<i>usp iucD</i>	<i>usp kps</i>	<i>usp hly</i>	<i>usp iucD hly kps</i>	<i>usp hly cnf-1 kps</i>	<i>usp iucD hly</i>	<i>usp cnf-1 kps</i>	<i>usp iucD kps</i>	<i>usp hly kps</i>	Total
<i>fimH</i>	5	1	5	1							12
<i>fimH papC/papGII</i>	1		1			1			2		5
<i>fimH papC/papGIII</i>										1	1
<i>fimH papC/papGII sfa</i>			1		3		1				5
<i>fimH papC/papGIII sfa</i>						3			1	1	5
<i>fimH sfa</i>			1		1	2		1			5
<i>fimH afa</i>	1								1		2
Negativo				1							1
Total	7	1	8	2	4	6	1	1	4	2	36

Legenda: *usp* (proteína uropatogênica específica); *fimH* (adesina fimbrial do tipo I); *kpsMTII* (montagem do grupo II capsular-K1, K5); *papC* (proteína de membrana externa da fimbria P); *papGI/GII/GIII* (alelos da adesina *papG*); *papE/F* (subunidades menores da fimbria P); *sfaD/E* (região conservada *sfa/foc*); *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina); *hlyA* (proteína estrutural hemolítica); *cnf-1* (fator necrozante citotóxico do tipo I); *afaB/C* (Região conservada âncora-chaperona).

V- DISCUSSÃO:

Escherichia coli é um habitante do trato intestinal do homem e animais homeotérmicos. Ainda que comumente inofensivas, várias cepas de *E. coli* têm adquirido determinantes genéticos ou genes de virulência, que as colocam como patogênicas para humanos e animais. Estes patógenos são responsáveis por três tipos principais de infecções clínicas: (i) doenças entéricas e diarreia, (ii) infecções do trato urinário e, (iii) sepsis e meningites. Baseado em suas distintas propriedades de virulência e sintomas clínicos do hospedeiro, as cepas patogênicas de *E. coli* foram divididas em numerosas categorias ou patotipos: as *E. coli* diarreio gênicas incluem a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC). As infecções extraintestinais são causadas por três patotipos diferentes: *E. coli* uropatogênicas (UPEC), *E. coli* envolvidas na meningite neonatal (MENE) e as que causam septicemias no homem e em animais (Bekal *et al*, 2003).

Os genes dos fatores de virulência são regulados por uma série de fatores (Cotter & Miller, 1996) e a sua expressão fenotípica muitas vezes é reprimida *in vitro*. A caracterização fenotípica da virulência é difícil e pouco reprodutível impedindo o estabelecimento de um padrão seguro nos ensaios laboratoriais. Por outro lado, a pesquisa de genes associados à virulência independe da expressão gênica, sendo uma poderosa ferramenta na caracterização de cepas.

Numerosos fatores de virulência, incluindo adesinas, modificadores da superfície da célula hospedeira, invasinas, toxinas e sistemas de secreção estão envolvidos nos mecanismos de patogenicidade das *E. coli*. Cepas de um dado patotipo são geneticamente similares e

carregam os mesmos determinantes de virulência envolvidos na infecção (Bekal *et al*, 2003, Dobrindt *et al*, 2003).

Estes genes de virulência são os alvos ideais para a determinação do potencial de patogenicidade de uma dada cepa de *E. coli*. Alguns métodos moleculares têm sido utilizados para detectar e identificar *E. coli* patogênicas, incluindo hibridização de DNA-DNA, PCR, PCR multiplex e Microarray (Van Ijperen *et al*, 2002, Bekal *et al*, 2003, Dobrindt *et al*, 2003).

Embora o genótipo não esteja diretamente correlacionado com a expressão fenotípica *in vivo*, os genes podem ser detectados através de técnicas moleculares, permitindo a realização de estudos epidemiológicos e análise da associação entre os fatores de virulência. No presente estudo foi desenvolvido e padronizado um modelo de ensaio de PCR para a detecção de genes de 14 fatores de virulência associados a *E.coli* (UPEC) isoladas de ITU.

Uma vez que as adesinas podem diferir quanto ao seu receptor nas células epiteliais, propriedades hemaglutinantes, propriedades sorológicas, codificação genética, aspectos morfológicos, além do fenômeno de variação de fase, ensaios fenotípicos que se baseiam no fato de uma cepa poder expressar várias adesinas diferentes, e/ou variantes diferentes de cada uma, ou de moléculas anti-aderentes que atuam como inibidores da adesão, são complexos e difíceis de serem realizados (Mol & Oudega, 1996; Smyth *et al*, 1996).

Enquanto estudos relatam a presença da adesina FimH (fimbria do tipo 1), participando do processo de colonização e/ou invasão nas células uroepiteliais (Gunther IV *et al*, 2001; Mulvey *et al*, 2000; Schilling *et al*, 2001), outros estudos relatam o não requerimento desta fimbria no processo de patogênese de ITU *in vivo* (Hull *et al*, 2002;

Miyazaki *et al*, 2002). Deste modo, a importância e função desta fimbria em processos patológicos permanecem ainda incertos.

Estudos vêm demonstrando que a presença da fimbria do tipo 1 no trato urinário inferior, aumenta a patogenicidade e persistência das UPEC, principalmente na bexiga, ocasionando cistite. Gunther IV *et al* (2001), observaram que durante o curso da infecção na bexiga encontra-se uma grande porcentagem de isolados expressando a fimbria do tipo 1, ou seja, estes isolados mantêm o elemento invertido na orientação ON, expressando a fimbria. Em contraste, isolados de pielonefrite possuem menor porcentagem de elementos invertidos na posição ON. Estas observações indicam que podem existir pelo menos dois grupos distintos de UPEC: um deles adaptado para colonizar o trato urinário inferior (cistite) e o outro grupo mais apto a infectar o trato urinário superior (pielonefrite).

Jonhson & Stell (2000) trabalhando com isolados de urosepsis, cujos pacientes apresentavam quadro clínico de inflamação e infecção no trato urinário, encontraram 100% de cepas *fimH*⁺. Morin & Hopkins (2002), estudando 86 amostras de UPEC provenientes de pacientes apresentando histórico clínico de ITU recorrente, encontraram 81 amostras *fimH*⁺, sendo este o único fator de virulência encontrado em aproximadamente um terço dos isolados. Já Obata-Yasuoka *et al* (2002), trabalhando com isolados de *E.coli* da urina e swab vaginal, detectaram 100% de isolados *fimH*⁺.

Nesta pesquisa foram utilizadas 162 amostras de *E. coli* isoladas de urina de pacientes apresentando sintomas de cistite. Nos ensaios de PCR, visando a detecção do gene para a fimbria do tipo 1, foram encontradas 154 cepas *fimH*⁺ (95,1%). Este resultado revela a alta frequência desta fimbria entre os isolados de ITU. Dentre as 154 cepas *fimH*⁺ detectadas foi observado que 50 cepas (32,4%) foram positivas somente para o gene *fimH*, estando ausente qualquer outro fator de virulência. Somam-se a estas 28 cepas (18,2%) em

que estavam presentes outros fatores de virulência pesquisados e que 76 cepas (49,3%) apresentaram diferentes adesinas associadas. Neste trabalho, 78 cepas isoladas de pacientes apresentando quadro clínico de cistite apresentaram apenas o gene para a adesina da Fímbria do tipo 1 (*fimH*), podendo-se observar a prevalência desta fímbria entre os isolados, uma vez que este foi o único fator de colonização presente e que a fímbria do tipo 1 pode ser a única responsável pela infecção do trato urinário.

O operon *pap* é estritamente organizado e depende de interações entre as subunidades para a formação das fimbrias e adesinas. O gene *papC* é uma região conservada do operon *pap*, cujo produto é uma proteína de membrana externa (PME) que parece ser requerida na formação de complexos estáveis chaperona-adesina-PME, iniciando a biogênese da fímbria *in vivo* (Thanassi *et al*, 2002). Além de *papC*, estudos demonstraram que as subunidades menores *papE/F*, são necessárias para a polimerização da adesina (Kuehn *et al*, 1994, Thanassi *et al*, 2002).

Assim, neste trabalho foram utilizados iniciadores para detecção dos genes referentes à proteína de membrana externa (*papC*), subunidades estruturais menores (*papE/F*) e os três alelos da adesina (*papGI*, *papGII*, *papGIII*) da fímbria P. A adesina *papG* foi classificada em alelos, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, de acordo com o tipo de receptor e tipo de infecção causada pela linhagem infectante (Karkkainen *et al*, 1998; Sung *et al*, 2001).

Estudos epidemiológicos demonstram que o alelo *papGIII* está associado com cistite aguda, enquanto o alelo II está comumente associado com pielonefrite e bacteremia. Sugere-se também que *papGII* participe da patogênese da bacteremia durante a ITU e outras infecções. Ainda não está claro, se isso é devido somente à presença do alelo *papGII* ou a outros fatores de virulência associados. Já o predomínio de *papGIII* na cistite, ou de

qualquer outro fator de virulência associado a este alelo, pode ser insuficiente para ocasionar invasividade na corrente sanguínea (Johnson, 1998; Tseng *et al*, 2001).

Em adultos com trato urinário comprometido, seja por anormalidades estruturais ou funcionais, ocorre a diminuição da predominância do alelo *papGII*, permitindo o desenvolvimento de infecções por *E. coli* com menor capacidade de adesão. O alelo *papGI* tem sido detectado em amostras de *E. coli* fecais e não é detectado em isolados de pielonefrite ou cistite (Tseng *et al*, 2001).

Dentre as 162 amostras estudadas, 53 amostras foram positivas para o gene *papC*, sendo que todas elas amplificaram o gene para a adesina *papG*, assim distribuídos: 29 amostras *papGII*⁺, 23 amostras *papGIII*⁺ e 1 amostra *papGII*⁺*papGIII*⁺. Confirmando os dados disponíveis na literatura, não foi detectado o gene *papGI* no grupo de cepas estudadas.

Ambos os alelos *papG* foram encontrados em associação com o gene da toxina hemolítica, sendo identificadas 12 amostras *papGII*⁺ e 18 amostras *papGIII*⁺*hly*⁺. Estes resultados corroboram com os resultados descritos na literatura, onde ambos os alelos são encontrados em cepas hemolíticas (Féria *et al*, 2001). Bingen-Bidois *et al* (2002), estudando linhagens provenientes de pacientes apresentando urosepsis (quadro clínico de inflamação e infecção no trato urinário, porém com isolamento do microrganismo pela hemocultura), também encontraram a associação entre os alelos *papGII* *papGIII* com o gene *hly*.

Em 53 amostras foi detectada a presença dos genes *papC* *papEF* *papG*. Estes resultados demonstram a presença dos genes associados à montagem e viabilidade da adesina na mesma amostra, uma vez que 32,1% das amostras estudadas apresentaram os três genes.

Nos resultados obtidos através da PCR, encontramos valores aproximados entre os alelos *papGII* e *papGIII*. Vinte e nove amostras foram *papGII*⁺ enquanto vinte e três foram *papGIII*⁺ e apenas uma amostra foi *papGII*⁺*papGIII*⁺. Nenhuma amostra foi positiva para o gene *papGI*, uma vez que este gene é encontrado em amostras isoladas de fezes. O resultado esperado era uma maior frequência de amostras positivas para o gene *papGIII*, uma vez que este gene está relacionado à cistite.

O gene da toxina CNF-1 tem sido relatado em associação com o gene da adesina *papGIII* (Blum *et al*, 1995; Johnson & Stell, 2000; Bingen-Bidois *et al*, 2002). Neste presente trabalho foram encontradas 15 amostras *papGIII*⁺*cnf-1*⁺ e apenas uma amostra *papGII* foi positiva para o gene *cnf-1*.

Além da fimbria P a colonização do trato urinário pode ser efetivada pela fimbria S. Esta fimbria é fortemente regulada por sinais ambientais como temperatura, meio de crescimento e osmolaridade. Ensaio fenotípicos demonstraram que ocorre variação na expressão fimbrial e muitas linhagens de *E. coli* não expressam a fimbria S em condições de laboratório (Skolowska-Kohler *et al*, 1997). Assim, estudos genotípicos permitem-nos pesquisar a presença da fimbria S (gene *sfaD/E* - região conservada do operon *sfa/foc*) e sua associação com outros fatores de virulência, independente da sua expressão fenotípica.

Embora a fimbria S esteja associada a pielonefrites, meningites e septicemias, no presente trabalho, em que foram estudadas amostras isoladas de cistites, foram identificadas por PCR 45 amostras *sfa*⁺ (27,8%). As fimbrias S são frequentemente associadas aos antígenos somáticos “O” e principalmente com a presença de cápsula “K”. Dentre as 45 amostras *sfa*⁺, 38 (84,4%) foram positivas na PCR para a determinação da presença do gene para cápsula dos tipos 1 e 5.

Tendo em vista que a fimbria S adere a receptores celulares compostos por glicoconjugados que contenham ácido siálico (Ott *et al*, 1988; Sarén *et al*, 1999) e, mais recentemente foi relatada a presença de resíduos de ácido siálico na Uroplaquina 3, proteína de membrana integral presente na superfície do lúmen da bexiga (Mulvey, 2002; Sakarya *et al*, 2003), pode-se inferir que a fimbria S também possa atuar efetivamente em infecções na bexiga.

A fimbria S também é encontrada em amostras que possuem genes para toxinas, principalmente a toxina CNF-1 e a hemolisina. Neste trabalho foram encontradas 27 amostras *sfa*⁺ *cnf-1*⁺ (60%) e 55,5% de amostras *sfa*⁺ *hly*⁺. Detalhando os perfis obtidos temos: 14 *sfa*⁺ *cnf-1*⁺, 12 amostras *sfa*⁺ *hly*⁺ e 13 *sfa*⁺ *hly*⁺ *cnf-1*⁺.

A associação com outras adesinas também tem sido descrita, principalmente com os alelos *papGII* e *papGIII* (Johnson & Stell, 2000; Bingen-Bidois *et al*, 2002). Deste modo foi proposto verificar a associação do gene da fimbria S com o gene *papG*. Em 28 amostras *sfa*⁺ o gene para adesina papG foi positivo, sendo encontradas 16 amostras (35,5%) *papGIII*⁺ e 12 (26,6%) amostras *papGII*⁺. Foi observada também a presença do gene da fimbria do tipo 1, (15 amostras (33,3%) *fimH*⁺), o que permite concluir serem essas amostras ainda mais aptas a colonizar com maior eficiência as células uroepiteliais. Também tem sido relatado na literatura que a fimbria S não é encontrada em amostras que possuem o gene para aerobactina (Johnson & Stell, 2000). Neste trabalho, diferente da literatura, foram encontradas 16 amostras *sfa* *iucD*⁺.

O gene *afa* é encontrado em baixa frequência nas cepas uropatogênicas e geralmente não está associado a outro fator de virulência. Tem sido encontrado apenas entre 0-12,5% de amostras *afa*⁺ em amostras uropatogênicas (Jonhson & Stell, 2000; Tseng *et al*, 2001; Miyazaki *et al*, 2002). Entre as adesinas afimbriais (Afa) as que são predominantemente

encontradas em cistite são: *afaE-1* e *afaE-3*. AfaE-1 pode causar cistite na ausência de outros fatores de virulência, enquanto AfaE-3 adere e invade células uroepiteliais ocasionando infecção na bexiga (Garcia *et al*, 2000; Selvarangan *et al*, 2000; Le Bouguénec *et al*, 2001; Mulvey, 2002).

Neste estudo foram encontradas apenas 10 amostras *afa*⁺ (6,2%) e destas, duas amostras foram *fimH*⁺*kps*⁺, duas amostras *fimH*⁺*iucD*⁺*kps*⁺, uma amostra *fimH*⁺*sfa*⁺*cnf-I*⁺*iucD*⁺*kps*⁺ e uma amostra *fimH*⁺*papC*⁺*papGII*⁺*iucD*⁺*hly*⁺*kps*⁺. Três amostras *afa*⁺ apresentaram apenas o gene para adesina FimH, estando ausente qualquer outro fator de virulência e, em uma amostra foi detectado o operon *pap*, não apresentando associação com outro fator de virulência. Os nossos resultados corroboram com os dados observados por outros pesquisadores, uma vez que o gene para a adesina Afa foi encontrado em baixa prevalência.

Linhagens que produzem Hly frequentemente produzem outros dois determinantes urovirulentos: CNF-1 e fimbria P. Estes três genes são encontrados na mesma ilha de patogenicidade (Blum *et al*, 1995; Johnson & Stell, 2000; Bingen-Bidois *et al*, 2002). Entre as 162 amostras de *E.coli* por nós estudadas, 41 amostras eram *hly*⁺ (25,3%) e 30 *cnf-I*⁺ (18,5%). Dentre as 41 amostras hemolíticas, 31 amostras foram *papC*⁺ (75,6%), 25 *sfa*⁺ (60,9%), 16 *cnf-I*⁺ (39,0%).

Devido à associação gênica entre CNF-1 e Hly, estudos sugerem que CNF-1 pode influenciar a ação da hemolisina, possivelmente pelo desencadeamento da internalização ou associação íntima de *E.coli* hemolíticas com células da bexiga, aumentando a efetividade da hemolisina (Island *et al*, 1998). A construção de mutantes isogênicos deficientes na produção de CNF1, demonstrou que esta toxina não altera a citotoxicidade de isolados hemolíticos de pacientes com cistite em cultura de células de bexiga humana *in vitro*

(Island *et al*, 1998). Dentre as 30 amostras *cnf-1*⁺, 27 amostras apresentaram-se associadas com *sfa*⁺, 16 amostras eram *papC*⁺ e 16 amostras eram *hly*⁺. Na literatura a adesina *sfaS* é encontrada em associação com a toxina CNF-1 (Johnson & Stell, 2000; Mulvey, 2002).

Johnson & Stell (2000), trabalhando com isolados de *E. coli* provenientes de urosepsis, pesquisaram 29 genes associados aos FV de UPEC. A toxina CDT foi um dos genes estudados, sendo encontrado 8% de amostras *cdt*⁺. Recentemente, Tóth *et al* (2003), pesquisando a ocorrência da toxina CDT de isolados patogênicos de *E. coli* de origem humana e de outros animais, estabeleceram uma nova variante desta toxina: CDT IV. Esses autores, utilizando os diferentes tipos de iniciadores para todas as variantes de CDT I-IV, detectaram 7,9% (15 de 190) amostras de UPEC *cdt*⁺. Neste trabalho, a presença do gene da toxina CDT foi pesquisado, porém diferente do relatado pelos autores acima citados, nas amostras por nós estudadas o gene da subunidade *cdtB* não foi detectado. Este resultado sugere que esta toxina não está relacionada à ITU, uma vez que a prevalência deste gene em amostras extraintestinais é baixa, não caracterizando esta toxina como um FV responsável pela patogenicidade.

Além da presença de fatores de colonização e toxinas, a aquisição de ferro para bactérias patogênicas é um pré-requisito para o processo infeccioso, pois a bactéria consegue invadir e multiplicar o tecido alvo, sendo que altos níveis de ferro podem levar a uma infecção mais rápida (Griffiths, 1997; Purdy & Payne, 2001; Torres *et al*, 2001). O sideróforo aerobactina, pela habilidade de captar ferro da transferrina, é considerado um fator de virulência encontrado em linhagens de *E. coli* isoladas de infecções extraintestinais, tanto de humanos quanto de animais domésticos. Em UPEC provenientes de cistite foi detectado este sistema de captação de ferro, associado à expressão da fimbria P e à toxina hemolisina (Jacobson *et al*, 1988).

Neste trabalho foi utilizado um par de iniciadores para o gene *iucD*, que codifica uma enzima ativa no passo inicial da biossíntese da aerobactina. Das 162 amostras estudadas, 42 amostras (25,9%) foram *iucD*⁺ pela PCR. Destas 42 amostras *iucD*⁺, 23 amostras foram *papC*⁺, 17 *hly*⁺ e 34 *kps*⁺. É interessante ressaltar que 27 amostras (64,3%) foram positivas para todos os genes encontrados em associação com a aerobactina descritos na literatura: *papC*⁺, *hly*⁺ e *kps*⁺. Já Bindgen-Bindois *et al* (2002), associam a presença da aerobactina com o alelo *papGII*, sendo que, neste trabalho esta associação foi encontrada em maior frequência, já que dentre as 29 amostras *papGII* encontradas, 20 (68,9%) apresentaram o gene *iucD*⁺ e dentre as 23 *papGIII*⁺ apenas três amostras (13,0 %) foram *iucD*⁺.

A maioria dos isolados uropatogênicos possui cápsulas do grupo II (K1, K5) e são cromossomicamente determinadas pelo gene *kps*. A presença da cápsula é comum e parece contribuir mais para o desenvolvimento de pielonefrites do que em cistites e uretrites (Jann & Jann, 1997). Em nosso estudo foram encontradas 86 cepas (53,1%) *kpsMTIII*⁺. Todas as 86 cepas *kpsMTIII*⁺, apresentaram associação com outro FV pesquisado. Johnson & Stell (2002), pesquisando isolados provenientes de pacientes com urosepsis, relataram a associação entre os fatores de virulência cápsula, o alelo *papGII* e aerobactina; também foi observada a associação positiva entre os genes *kpsMTIII* e *hlyA*. Neste presente trabalho, foi observado que os resultados correspondem àqueles citados na literatura, uma vez que foram encontradas 19 amostras *papGII*⁺*kps*⁺*iucD*⁺ e apenas três amostras *papGIII*⁺*kps*⁺*iucD*⁺. Além disso, a cápsula foi encontrada em 36 cepas *hly*⁺ (87,8%), 34 cepas *iucD*⁺ (80,9%) e em 27 cepas *cnf-I*⁺(90%).

Recentemente, Kurazono *et al* (2000), identificaram uma nova proteína associada a linhagens de UPEC, sendo denominada proteína específica uropatogênica. USP é

encontrada em maior prevalência em linhagens de UPEC, do que em linhagens fecais de indivíduos saudáveis, sendo encontradas em todos os sorogrupos comuns de UPEC.

Em estudo conduzido no Japão o gene *usp* foi detectado em 24% das 50 amostras de *E.coli* de indivíduos saudáveis, em 80% dos 195 isolados de cistite e em 93% dos 73 isolados de pielonefrite (Kurazono *et al*, 2000), associando a alta incidência da proteína com a patogênese da ITU, ou seja, a presença de USP aumenta a infectividade no trato urinário. Já no estudo realizado por Bauer *et al* (2002), verificou-se que o gene *usp* foi encontrado em menor frequência nos isolados de ITU do que naquela coleção estudada no Japão e que o resultado obtido não caracteriza a associação da proteína USP com ITU.

Em trabalho realizado por Parret & De Mot (2002), foi descoberto que a proteína USP tem homologia relativa às piocinas que são produzidas por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, pertencendo a um grande grupo heterogêneo de proteínas conhecidas como bacteriocinas. É sugerido que a proteína USP atue como uma bacteriocina, contra a competição de linhagens de *E.coli* que ocupam o mesmo nicho, aumentando desta forma, sua infectividade no trato urinário.

Neste trabalho foram detectadas 36 amostras *usp*⁺ (22,2%). Esta proteína foi encontrada em 5 amostras apenas *fimH*⁺*usp*⁺, em 69,4% das amostras que possuíam o gene para cápsula, em 41,7% das amostras *hly*⁺ em 27,8% das amostras *iucD*⁺ e em 19,4% das amostras *cnf-I*⁺. A proteína específica uropatogênica foi menos frequente do que naquela coleção de isolados estudados no Japão. Este resultado pode ser devido a diferenças nos tipos de amostras individuais coletadas ou pode refletir variação geográfica da coleta das amostras.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, observamos que o gene para adesina papGII foi encontrado em amostras que possuíam os genes *kps*, *iucD* e *hly*, não

sendo observada associação com o gene *cnf-1*. Já o alelo *papGIII* foi encontrado em amostras que apresentavam os genes *kps*, *hly* e *cnf-1*. Ambos os alelos foram detectados em amostras que possuíam o gene para a fimbria S. Os genes *cnf-1*, *hly* e *kps* foram encontrados em amostras *sfa*⁺ e, como dito anteriormente, as amostras positivas para o gene *sfa*⁺ também foram amplificadas para os genes dos alelos da fimbria P.

Este trabalho teve como objetivo um estudo epidemiológico visando caracterizar genotipicamente amostras de *E.coli* isoladas de pacientes apresentando quadro clínico de cistite, definindo a frequência e associação dos fatores de virulência encontrados em UPEC. Os resultados demonstraram que as amostras estudadas apresentaram um ou mais dos fatores de virulência possíveis de estarem envolvidos na patogênese da infecção. Além disso, foi verificada a presença de dois ou mais tipos de fatores de colonização em uma dada amostra, sugerindo que estas amostras estavam mais aptas a colonizarem diferentes tipos de tecidos do trato urinário.

Os resultados do presente trabalho poderão auxiliar estudos relacionados à patogênese da ITU, uma vez que estes dados podem auxiliar as investigações das propriedades bacteriológicas da *E.coli*, assim como a importância do grau de patogenicidade presente em cada amostra de UPEC.

VI- CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos com o uso da técnica de PCR demonstraram que o gene para a fimbria do tipo 1 (*fimH*) foi detectado em 95,1% das amostras provenientes de pacientes com cistites.
- Os genes que codificam para fimbria P (*papC papG papE/F*), fimbria S (*sfaD/E*) e adesina afimbrial (*afaB/C*) foram detectados pela PCR em 32,7%, 27,8% e 6,2%, respectivamente, das amostras de *E.coli* estudadas.
- Em 25,3% das amostras o gene *hly* foi detectado pela PCR e em 18,5% das amostras foi amplificado o gene *cnf-1*. O gene para a toxina CDT não foi identificado neste grupo de cepas e, aparentemente, não está associado à cistite.
- O gene para o alelo *papGII* foi detectado em amostras cujos genes *hly*, *iucD* e *kps* estavam presentes na mesma amostra estudada, enquanto o gene para o alelo *papGIII* foi amplificado em amostras onde estavam presentes os genes *cnf-1*, *hly* e *kps*.
- No estudo do gene *sfaD/E* pertencente à fimbria S, foi observada uma maior frequência deste gene com os FV cápsula, alelos *papG* e as toxinas CNF-1 e Hly. Em 84,4% das amostras *sfa*⁺ foram detectados o gene *kps*⁺, 62,2% das amostras *papG*⁺, 60,0% das amostras *cnf-1*⁺ e 55,5% das amostras *hly*⁺.
- O gene para a proteína específica uropatogênica (*usp*) foi detectado em 22,2% das amostras estudadas, sendo que 69,4% das amostras eram *kps*⁺ e 41,7% das amostras eram *hly*⁺.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BACKHED, F; ALSÉN, B; ROCHE, N; ANGSTRON, J; VON EULER, A; BREIMER, M. E; WESTERLUN-WIKSTROM, B; TENEBERG, S; RICHTER-DAHLFORS, A. Identification of target tissue glucosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated and its role in mucosal inflammation. **J. Biol. Chem**, v. 277, p. 18198-18205, 2002.

BAUER, J; ZHANG, L; FOXMAN, B; SIITONEN, A; JANTUNEN, M. E; SAXEN, H; MARRS, C. F. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection – usp, iha, and iro (N.sub.*E.coli*). **J. Infect. Dis**, v. 185, p. 1521-1524, 2002.

BEKAL, S; BROUSSEAU, R; MASSON, L; PREFONTAINE, G; FAIRBROTHER, J; HAREL, J. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarray. **J. Clin. Microbiol**, v. 41, p. 2113-2125, 2003.

BINGEN-BIDOIS, M; CLERMONT, O; BONACORSI, S; TERKI, M; BRHIMI, N; LOUKIL, C; BARRAUD, D; BINGEN, E. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. **Infect. Immu**, v. 70 (6), p. 3216-3226, 2002.

BLANCO, J; BLANCO, M; ALONSO, M. P; GARABAL, J. I; BLANCO, J. E; GONZÁLEZ, E. A. Factores de virulencia de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. Universidade de Santiago de Compostela, 1992.

BLANCO, M; BLANCO, J.E; RODRÍGUEZ, E; ABALIA, I; ALONSO, M. P; BLANCO, J. Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. **J. Microl. Meth.** v. 31, p. 37-43, 1997a.

BLANCO, M; BLANCO, J.E; ALONSO, M.P; MORA, A; BASALOBRE, 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.** v. 148, p. 745-755, 1997b.

BLISS, J. M & SILVER, R. P. Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. **Mol. Microbiol.** v. 21 (2), p. 221-231, 1996.

BLUM, G; FALBO, V; CAPRIOLI, A; HACKER, J. Gene cluster encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, prs-fimbriae and alpha hemolysin from the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. **FEMS. Microbiol. Letters**, v. 126, p. 189-195, 1995.

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

BRAUN, V. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. **FEMS. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 295-307, 1995.

CAPRIOLI, A; FALBO, V; RODA, L. G; RUGGERI, F. M; ZONA, C. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infect. Immun.**, v.39, p.1300-1306, 1983.

COTTER, P.A; & MILLER, J.F. Triggering bacterial virulence. **Science** v. 273, p. 1183-1184, 1996.

DAIGLE, F; HAREL, J; FAIRBROTHER, J.M. Expression and detection of *pap*, *sfa*, and *afa*- encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. **Clin. J. Microbiol.**, v.40, p.286 – 291, 1994.

DOBRINT, U; BLUM-OEHLER, G; HARSCH, T; GOTTSCHALK, G; RON, E. Z; FUNFSTUCK, R; HACKER, J. S-Fimbria-Encoding determinant *sfa_I* is located on pathogenicity island III₅₃₆ of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. **Infect. Immun.**, v. 69 (7), p. 4248-4256, 2001.

DOBRINDT, U; AGERER, F; MICHAELIS, K; JANKA, A; BUCHRIESER, C; SAMUELSON, M; SVANBORG, C; GOTTSCHALK, G; KARCH, H., HACKER, J. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 1831–1840, 2003.

ELWELL, C. A. & DREYFUS, L. A. Dnase I homologous residues in cdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. **Mol. Microbiol**, v.37, p. 952-963, 2000.

ELWELL, C.; CHAO, K.; PATEL, K.; DREYFUS, L. *Escherichia coli* CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. **Infect. Immun**, v.69, p. 3418-3422, 2001.

FÉRIA, C; MACHADO, J; CORREIA, J. D; GONÇALVES, J; GAASTRA, W. Distribution of *papG* alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 202, p. 205-208, 2001.

FIorentini, C; ARANCIA,G; CAPRIOLI,A; FALBO, V; RUGGERI, M; DONELLI, G. Cytoskeletal changes induced in Hep-2 cells by the cytotoxic necrotizing factor of *Escherichia coli*. **Toxicon**, v. 26, p. 1047-1056, 1988.

GARCIA, M. I & LE BOUGUÉNEC, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli* . **Bull. Inst. Pasteur**, v. 94, p. 201-236, 1996.

GARCIA, M-I; JOUVE, M; NATARO, J. P; GOUNON, P; LE BOUGUÉNEC, C. Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extra-intestinal infections. **FEBS. Letters**, v. 479, p. 111-117, 2000.

GÉRARDIN, J; LALIOUI, L; JACQUEMIN, E; LE BOUGUÉNEC, C; MAINIL, J. G. The afa-related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the afa-8 variant. **Vet. Microbiol**, v. 76, p. 175-184, 2000.

GRIFFITHS, E. Iron and the virulence of *Escherichia coli*. In M. Sussman, *Escherichia coli* mechanisms of virulence, p. 331-371. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1997.

GUNTHER IV, N. W; LOCKATELL, V; JOHNSON, D. E; MOBLEY, H. L. T. In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *E.coli* during experimental urinary tract infection. **Infect. Immun**, v. 69 (5), p. 2838-2846, 2001.

GUYER, D. M; GUNTHER, N.W; MOBLEY, H. L. T. Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis**, v. 183 (1), p. 32-35, 2001.

GUYER, D. M; RADULOVIC, S; JONES, F-E; MOBLEY, H. L. T. Sat, the Secreted Autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli* is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infect. Immun**, v. 70 (8), p. 4539-4546, 2002.

HACKER, J & KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Ann. Rev. Microbiol**, v. 54, p. 641-679, 2000.

HULL, R. A; DONOVAN, W.H; DEL TERZO, M; STEWART, C; ROGERS, M; DAROUICHE, R.O. Role of type 1 fimbria and P fimbriae- specific adherence in

colonization of the neurogenic human bladder by *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v.70 (11), p. 6481-6484, 2002.

ISLAND, M. D; CUI, X; FOXMAN, B; MARRS, C.F; STAMM, W. E. STAPLETON, A. E; WARREN, J. W. Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1-positive and negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells. **Infect. Immun.** v. 66 (7), p. 3384-3389, 1998.

JACOBSON, S. H; TULLUS, K; WRETLIND, B & BRAUNER, A. Aerobactin-mediated uptake of iron by strains of *Escherichia coli* causing pyelonephritis and bacteremia. **J.Infect.** v. 16, p. 147-152, 1988.

JANN & JANN. Capsules of *Escherichia coli*. In M. Sussman, *Escherichia coli* mechanisms of virulence, p. 331-371. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1997.

JOHNSON, W. M.& LIOR, H. Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possibly misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. **FEMS. Microbiol. Lett.** 43: 19-23, 1987.

JOHNSON, W. M.& LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. **Microb. Pathog.** 4: 115-126, 1988a.

JOHNSON, W. M. & LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. **Microb. Pathog.** 4: 103-113, 1988b.

JOHNSON, J. R; MOSELEY, S. L; ROBERTS, P. L & STAMM, W. E. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. **Infect. Immu**, v. 56, p. 405-412, 1988.

JOHNSON, J.R. *papG* alleles among *Escherichia coli* strains causing urosepsis: associations with other bacterial characteristics and host compromise. **Infect. Immu**, v. 66 (9), 4568-4571, 1998.

JOHNSON, J. R; O'BRIAN, T. T; LOW, D. A; LING, G; DEVALARI, P; FASCHING, C; RUSSO, T. A; CARLINO, U; STEL, A. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *pap G* allele III. **Infec. Immun**, v. 68 (6), p. 3327-3336, 2000 .

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

JOHNSON, J. R; STELL, A . L; DELAVARI, P; MURRAY, A. C; KUSKOWSKI, M; GAASTRA, W. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. **J. Infect. Dis**, v. 183, p. 897-906, 2001.

JOHNSON, J. R & RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E.coli*". **J. Lab. Clin. Med**, v. 139 (3), p. 155-160, 2002.

JOHNSON, J. R; KUSKOWSKI, M. A; O'BRYAN, T. T; MASLOW, J. N.
Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among
Escherichia coli blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. **J. Infect. Dis**,
v. 185, p. 1439-1447, 2002.

KÄLLENIOUS, G; MÖLLBY, R; HULTBERG, H; SVENSON, S. B; CEDERGREN, B;
WINBERG, J. Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for
pyelonephritogenic *Escherichia coli*. **Lancet II**, 604 – 606, 1981.

KARKKAINEN, U.M; KAUPPINEN, J; IKAHEIMO, R; KATILA, M. L; SIITONEN, A.
Rapid and specific detection of three different G adhesin classes of P-fimbriae in
uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. **J. Microl. Meth**, v. 34, p.
23-29, 1998.

KAYSER, H. Ueber Bakterienhamolysine, im Besonderen das Colilysin. **Zeitschrift für
Hygiene und Infektionskrankheiten**, v. 42, p. 118-138, 1903.

KHAN, A. S; KNIEP, B; OESLCHLAEGER, T. A; VAN DIE, I; CORONEN, T;
HACKER, J. Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* .
Infec. Immun, v. 68 (6), p. 3541-3547, 2000.

KUEHN, M. J; JACOB-DUBUISSON, F; DODSON, K; SLONIM, L; STRIKER, R;
HULTGREN, S. J. Genetic, biochemical, and structural studies of biogenesis of adhesive
pili in bacteria. **Meth. in Enzym**, v. 236, p. 282-306, 1994.

KURAZONO, H; YAMAMOTO, S; NAKANO, M; NAIR, G. B; TERAJ, A; CHAICUMPA, W; HAYASHI, H. Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. **Microb. Pathog**, v. 28, p. 183-189, 2000.

LABIGNE-ROUSSEL, A. F; LARK, D; SCHOOLNIK, G; FALKOW, S. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (Afa-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immu**, v. 46, p. 251-259, 1984.

LALIOUI, L & LE BOUGUÉNEC, C. Afa8 Gene cluster is carried by a pathogenicity island inserted into the tRNA^{Phe} of human and bovine pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Infect. Immu**, v. 69 (2), p. 937-948, 2001.

LARA-TEJERO, M. & GALÁN, J. E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. **Science**, v. 290, p. 354-357, 2000.

LARA-TEJERO, M. & GALÁN, J. E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infect. Immun**, v. 69, p. 4358-4365, 2001.

LE BOUGUÉNEC, C; ARCHAMBAUD, M; LABIGNE A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol**, v. 30 (5), p. 1189-1193, 1992.

LE BOUGUÉNEC, C; GARCIA, M. I; OUN, V; DESPERRIER, J. M; GOUNON, P; LABIGNE, A. Characterization of plasmid-borne afa-3 gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 5106-5114, 1993.

LE BOUGUÉNEC, C & BERTIN, Y. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. **Vet. Res.**, v. 30(2-3), p.317-42, 1999.

LE BOUGUÉNEC, C; LALIOU, L; MERLE, L; JOUVE, M; COURCOUX, P; BOUZARI, S; SELVARANGAN, R; NOWICKI, B. J; GERMANI, Y; ANDREMONT, A; GOUNON, P; GARCIA, M. I. Characterization Of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *escherichia coli* isolates: pcr assays for detection of afa adhesins that do or do not recognize dr blood group antigens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39 (5), p. 1738-1745, 2001.

LUDWIG & GOEBEL. Haemolysins of *Escherichia coli*. In M. Sussman, *Escherichia coli* mechanisms of virulence, p. 331-371. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1 ed, 1997.

MALAGOLINI, N; CAVALLONE, D; WU, X. R; SERAFINI-CESSI, F. Terminal glycosylation of bovine uroplakin III, one of the major integral-membrane glycoproteins of mammalian bladder. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 26, p. 231-237, 2000.

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

MILLS, M; MEYSICK, K. C; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic Necrotizing Factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. **Infect. Immu**, v. 68 (10), 5869-5880, 2000.

MIYAZAKI, J; BA-THEIN, W; KUMAO, T; YASUOKA, M. O; AKAZA, H; HAYASHI, H. Type 1, P, and S fimbriae, and afimbrial adhesion I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. **FEMS. Immun. Med. Microb**, v. 33, p. 23-26, 2002.

MOL, O & OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli* . **FEMS. Microb. Rev**, v. 19, p. 25-52, 1996.

MORIN, M. S. & HOPKINS, W. J. Identification of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction and their association with infectivity in mice. **Urology**, v. 60 (3), p. 537-541, 2002.

MULVEY, M. A, SCHILLING, J. D; MARTINEZ, J. J; HULTGREN, S. Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. **PNAS**, v. 97 (16), p. 8829-8835, 2000.

MULVEY, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol**, v. 4 (5), p. 257-271, 2002.

NAKANO, M; YAMAMOTO, S; TERAJ, A; OGAWA, O; MAKINO, S; HAYASHI, H; NAIR, G. B; KURAZONO, H. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. **FEMS. Microbiol. Letters**, v. 205, p. 71-76, 2001.

NOWICKI, B; LABIGNE, A; MOSELEY, S; HULL, R; HULL, S; MOULDS, J. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesions Afa-I and Afa-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infect. Immu**, v.58, p. 279-281, 1990.

NOWICKI, B; SELVARAGAN, R; NOWICKI, S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesions: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. **J. Infect. Dis.** V. 183, p. 24-27, 2001.

OBATA-YASUOKA, M; BA-THEIN, W; TSUKAMOTO, T; YOSHIKAWA, H; HAYASHI, H. Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E.coli*. **Microbiology**, v. 148, p. 2745-2752, 2002.

OELSCHLAEGE, T. A; DOBRINDT, U; HACKER, J. Pathogenicity islands of uropathogenic *Escherichia coli* and the evolution of virulence. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 19, p. 517-521, 2002.

OKUDA, J.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y. Distribution of cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. **Microb. Pathog.**, v.18, p. 167-172, 1995.

ORSKOV, I & ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. **J. Higiene.** Cambridge, v. 95, p. 551-575, 1985.

ORSKOV, I; SVANBORG, E. C & ORSKOV. F. Aerobactin production of serotyped *Escherichia coli* from urinary tract infections. **Med. Microbiol. Imunn.**, v. 177, p. 9-14, 1988.

OTT, M; HOSCHÜTZKY, H; JANN, K; VAN DIE, I; HACKER, J. Gene cluster for S fimbrial adhesin (*sfa*) and F1C fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: Comparative aspects of structures and function. **J. Bacteriol.**, v. 170 (9), p. 3983-3990, 1988.

PAK, J; PU, YONGBING; ZHANG, Z-T; HASTY, D. L; WU, X-R. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E.coli* from binding to uroplakin 1a and 1b receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 276 (3), p. 9924-9930, 2001.

PARRET, A. H. A & DE MOT, R. *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? **Microbiology**, v.148, p. 1604-1606, 2002.

PICKETT, C. L.; COTTLE, D. L.; PESCI, E. C.; BIKAH, G. Cloning, sequencing and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. **Infect. Immun**, v. 62, p. 1046-1051, 1994.

PICKETT, C. L.; PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; RUSSEL, G.; ERDEM, A. N.; ZEYTIM, H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *CdtB* genes. **Infect. Immun**, v.64, p. 2070-2078, 1996.

PURDY, G. E & PAYNE, S. M. The SHI-3 iron transport island of shigella boydii 0-1392 carries the genes for aerobactin synthesis and transport. **J. Bacteriol**, v. 183 (4), p. 4176-4182, 2001.

PURVÉN, M.; FRISK, A.; LÖNNROTH, I.; LAGERGARD, T. Purification and identification of *Haemophilus ducreyi* cytotoxin by use of a neutralizing monoclonal antibody. **Infect. Immun**, v. 65, p. 3496-3499, 1997.

RIPPERE-LAMPE, K. E; O'BRIEN, A. D; CONRAN, R; LOCKMAN, H. A. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun**, v. 69 (6), p. 3954-3964, 2001.

RUSSO, T.A; WENDEROTH, S; CARLINO, U. B; MERRICK, J. M; LESSE, A. J. Identification, genomic organization, and analysis of the group III capsular polysaccharide genes *kpsD*, *kpsM*, *kpsT*, and *kpsE* from an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (CP9,O4/K54/H5). **J. Bacteriol**, v.180 (2), p.338-49,1998.

RUSO, T. A & JOHNSON, J. R. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

RUSO, T. A; McFADDEN, C. D; CARLINO-MacDONALD, U. B; BEANAN, J. M; BARNARD, T. J; JOHNSON, J. R. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. **Infect. Immu**, v. 70 (12), p. 7156-7160, 2002.

SAKARYA, S; ERTEM, G. T; ONCU, S; KOCAK, I; EROL, N; ONCU, S. *Escherichia coli* bind to urinary bladder epithelium through nonspecific sialic acid mediated adherence. **FEMS. Immun. Med. Microbiol**, v. 39, p. 45-50, 2003.

SARÉN, A; VIRKOLA, R; HACKER, J; KORHONEN, T. K. The cellular form of human fibronectin as an adhesion target for the S fimbriae of meningitis-associated *Escherichia coli*. **Infect. Immu**, v. 67 (5), p. 2671-2676, 1999.

SCHEMBRI, M. A; HASMAN, H; KLEMM, P. Expression and purification of the mannose recognition domain of the FimH adhesin. **FEMS. Microbiol. Letters**, v. 188, p. 147-151, 2000.

SCHEMBRI, M. A; KJAERGAARD, K; SOKURENKO, E. V; KLEMM, P. Molecular characterization of the *Escherichia coli* FimH adhesin. **J. Infect. Dis**, v. 183, p. 28-31, 2001.

SCHENKER, B. J; McKAY, T; DATAR, S; MILLER, M; CHOWHAN, R; DEUTH, D. Actinobacillus actinomycetemcomitans immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins of causing a G₂ arrest in human T cells. **J. Immunol**, v. 162, p. 4773-4780, 1999.

SCHILLING, J. D; MULVEY, M. A.; HULTGREN, S. J. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: New insight into the pathogenesis of urinary tract infections. **J Infect. Dis**, v. 183, p 36-40, 2001.

SCOTT, D. A. & KAPER, J. B. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. **Infect. Immun**, v. 62, p. 244-25, 1994.

SELVARANGAN, R; GOLUSZKO, P; POPOV, V; SINGHAI, J; PHAM, T; LUBLIN, D. M; NOWICKI, S; NOWICKI, B. Role of decay-accelerating factor domains and anchorage in internalization of dr-fimbriated *Escherichia coli*. **Infect. Immun**, v. 68 (3), p. 1391-1399, 2000.

SILVA, A. S; LEITE, D. S. Investigation of putative CDT gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea. **Vet. Microbiol**, v. 89, p. 195-199, 2002.

SMITH, H. W & HALLS. S. The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls haemolysin production. **J. Gen. Microbiol**, v. 47, p. 153-161, 1967.

SMYTH, C. J; MARRON, M. B; TWOHIG, J. M. G. J; SMITH, S. G. J. Fimbrial adhesions: similarities and variations in structure and biogenesis. **Fems. Immun. Med. Microb**, v. 16, p. 127-139, 1996.

SOKOLOWSKA-KOHLER, W; SCHONIAN, G; BOLMANN, R; SCHUBERT, A; PARSCHAU, J; SEEBERG, A; PRESBER, W. Occurrence of S and F1C/S-related fimbrial determinants and their expression in *Escherichia coli* strains isolated from extraintestinal infections. **FEMS. Immun. Med. Microb**, v. 18, p. 1-6, 1997.

STENTEBJERG-OLESEN, B; CHAKRABORTY, T; KLEMM, P. FimE-catalyzed off-to-on inversion of the type 1 fimbrial phase switch and insertion sequence recruitment in an *Escherichia coli* K-12 *fimB* strain. **FEMS Microbiol Letters**, v. 182, p. 319-325, 2000.

SUNG, M; FLEMING, K; CHEN, H. A; MATTHEWS, S. The solution structure of PapGII from uropathogenic *Escherichia coli* and its recognition of glycolipid receptors. **EMBO Reports**, v. 71, p. 621-627, 2001.

SUSSMAN.M. *Escherichia coli* : Mechanism of virulence. Cambridge University press, 1ed, 1997.

SVENSON S. B; HULTBERG, H; KÄLLENIOUS, G; KORHONEN, T. K; MÖLLBY, R; WINBERG, J. P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: identification and chemical characterization of receptors. **Infection**, v. 11, p 61-67, 1983.

THANASSI, D. G; STAPHOPOULOS, C; DODSON, K; GEIGER, D; HULTGREN, S. J. Bacterial outer membrane ushers contain distinct targeting and assembly domains for pilus biogenesis. **J. Bacteriol**, v. 184 (22), p. 6260-6269, 2002.

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. **J.Clin. Invest**, v.100 (5), p. 123-1136, 1997.

THARIATH, A; SOCHA, D; VALVANO, M. A; VISWANATHA, T. Construction and biochemical characterization of recombinant cytoplasmic forms of the lued protein (lysine:n6-hydroxylase) encoded by the pcolv-k30 aerobactin gene cluster. **J. Bacteriol**, v. 175 (3), p. 589-596, 1993.

TÓTH, I; HÉRAULT, F; LOTHAR, B; OSWALD, E. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). **J. Clin Microbiol**, v. 41 (9), p. 4285-4291, 2003.

TSENG, C. C; HUANG, J.J; KO, W. C; YAN, J. J; WU, J. J. Decrease predominance of *papg* class II allele in *Escherichia coli* strains isolated from adults with acute pyelonephritis and urinary tract abnormalities. **J. Urol**, v. 166, p. 1643-1646, 2001.

TORRES, A. G; REDFORD, P; WELCH, R. A; PAYNE, S. M. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. **Infect. Immun** v. 69(10), p. 6179-6185, 2001.

VAISANEN-RHEN, V. Fimbria-like hemagglutinin of *Escherichia coli* O75 strains. **Infect. Immun**, v. 46, p. 401-407, 1984.

VAN IJPEREN, C; KUHNERT, P; FREY, J; CLEWLEY, J. P. Virulence typing of *Escherichia coli* using microarrays. **Mol. Cel. Probes**, v. 16, p. 371-378, 2002.

YAMAMOTO, S; TERA, A; YURI, K; KUROZONO, H; TAKEDA, Y; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factor in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS.Immun. Med. Microbiol**, v. 12, p. 85-90, 1995.

WESTERLUND, B; KUUSELA, P; RISTELI, J. The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. **Mol. Microbiol**, v. 3, p. 329-337, 1989.

WULT, B; BERGSTEN, G; SAMUELSSON, M; GEBRETSADIK, N; HULL, R; SVANBORG, C. The role of P fimbriae for colonization and host response induction in the human urinary tract. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.21 (6), p. 605-21, 2001.

