

ROGÉRIO ARCURI CONCEIÇÃO

"Análise proteômica, molecular e funcional de potenciais adesinas de *Escherichia coli* associada à sepse humana (SEPEC)"

"Proteomics, molecular and functional analysis of potential adhesins from human sepsis associated Escherichia coli (SEPEC)"

Campinas, 2014

ii



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

ROGÉRIO ARCURI CONCEIÇÃO

"Análise proteômica, molecular e funcional de potenciais adesinas de *Escherichia coli* associada à sepse humana (SEPEC)"

Orientador: Dr. Tomomasa Yano

"Proteomics, molecular and functional analysis of potential adhesins from human sepsis associated *Escherichia coli* (SEPEC)"

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Doctorate thesis presented to the State University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology, Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Biology Institute, in the area of Microbiology.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno **Rogério Arcuri Conceição** e orientado pelo Dr. Tomomasa Yano.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2014

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

 Conceição, Rogério Arcuri, 1983-Análise proteômica, molecular e funcional de potenciais adesinas de *Escherichia coli* associada à sepse humana (SEPEC) / Rogério Arcuri Conceição. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.
Orientador: Tomomasa Yano. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. *Escherichia coli*. 2. Adesinas de *Escherichia coli*. 3. Proteínas de membrana. 4. Sepse. 5. Adesão. 6. Invasão celular. I. Yano, Tomomasa,1941-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Proteoimics, molecular and functional analysis of potential adhesins from human sepsis associated Escherichia coli (SEPEC) Palavras-chave em inglês: Escherichia coli Adhesins, Escherichia coli Membrane proteins Sepsis Adhesion Cell invasion Área de concentração: Microbiologia Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular Banca examinadora: Tomomasa Yano [Orientador] Cristina Elisa Alvarez Martinez Wanderley Dias da Silveira Terezinha Knöbl Roxane Maria Fontes Piazza Data de defesa: 15-08-2014 Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 15 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tomomasa Yano (orientador)

Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez

Prof. Dr. Wanderley Dias Da Silveira

Profa. Dra. Teresinha Knöbl

Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

Prof. Dr. Gerson Nakazato

Dra. Janaina Luisa Leite Garbin

Dr. Robert Alvin Bernedo Navarro

sinatura

Custinate Award Achine Assinatura

rel

Assinatura

1 Assinatura

UR Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

vi

Abstract

Our preliminary studies about bacterial adhesion and invasion showed 100% of 49 strains of human sepsis-associated Escherichia coli (SEPEC) were able to adhere and invade Vero (African green monkey kidney) and HUVEC (human umbilical vein) cells. In genotypic analysis, high prevalence of *fim*H (98.0%), gene encoding for the type 1 fimbrial adhesin was observed. However, all the strains analyzed were able to adhere and invade these cellular lineages both in the presence and absence of the type 1 fimbriae adherenceinhibitor α -D-mannopiranoside. Consequently, the outer membrane proteins of SEPEC were analyzed in order to find potential adhesion and invasion factors expressed by these strains. Through proteomic techniques, three proteins with affinity to cellular glycoproteins were identified: OmpA (Membrane Protein A); FimA (major subunit of type 1 fimbriae -F1) and YdeR (minor subunit of type 9 fimbriae - F9). These data were consistent with the genotypic analysis of SEPEC strains because a high percentage of the genes encoding these three proteins was observed, being that $ompA^+$ (100%) fimA⁺ (98%) and $vdeR^+$ (100%). Assays of adhesion and invasion of SEPEC (OmpA⁺ / F1⁺) in Vero and HUVEC cells showed that α -D-manopiranosideo and GlcNAc, when acting together, act as potent inhibitors of adhesion and invasion, suggesting that these molecules could be occupying sites of carbohydrate-binding displayed by adhesins from both F1 and/or OmpA, respectively. To confirm this hypothesis, null mutants $\Delta finA$ (OmpA⁺/F1⁻) and $\Delta ompA$ $(OmpA^{-}/F1^{+})$ were constructed, and the phenotypic results of bacterial adhesion and invasion were similar to those obtained in the presence of inhibitors α -D-mannopiranoside and GlcNAc. The mutant $\Delta ydeR$ (OmpA⁺ / F1⁺), null mutant for YdeR protein of F9 fimbriae, showed a significant reduction in bacterial adhesion and invasion in Vero and HUVEC ($p \le 0.05$) just in the presence of inhibitors of cell adhesion mediated by F1 and OmpA. These data suggest that F9 also can contribute to the adhesion and invasion of SEPEC in Vero and HUVEC cells. Hold together, our data demonstrated that adhesion and invasion of SEPEC are OmpA, F1 and F9 dependents, which can be complementary and express synergistic activity leading to enhancing the ability of adhesion and invasion in SEPEC strains.

Key words: *Escherichia coli*, Adhesins, membrane pronteins, sepsis, adhesion, cell invasion

viii

Resumo

Estudos preliminares sobre adesão e invasão mostraram que 100% de 49 amostras de Escherichia coli associada à sepse humana (SEPEC) foram capazes de aderir e invadir células Vero (Rim de macaco verde africano) e Huvec (Veia umbilical humana). Em análise genotípica, foi observada uma alta prevalência dos genes fimH (98,0%) que codificam para a adesina da fimbria de tipo 1 (F1). No entanto, as cepas analisadas aderiram tanto na presença quanto na ausência de α -D-manopiranosideo, um inibidor da adesão mediada pela F1. Por esse motivo foram analisadas as proteínas de membrana externa de SEPEC, com o objetivo de se avaliar potenciais fatores adesão e invasão dessas cepas. Por técnicas de proteômica, foram identificadas três proteínas de SEPEC com afinidade a glicoproteínas celulares: OmpA (Proteína de membrana A); FimA (Subunidade maior da fimbria do tipo 1) e YdeR (Subunidade menor da fimbria do tipo 9 - F9). Esses dados foram coerentes com a análise genotípica das amostras SEPEC, pois foi observada uma alta porcentagem dos genes que codificam para as três proteínas descritas anteriormente, sendo que 100% das amostras foram $ompA^+$, 98,0% foram fim A^+ e 100% foram ydeR^{+.} Os ensaios de adesão e invasão de SEPEC (OmpA⁺/ F1⁺) em células Vero e Huvec mostraram que a-D-manopiranosideo e GlcNAc, quando atuando juntos, agem como potentes inibidores da adesão e invasão, sugerindo que essas moléculas poderiam estar ocupando os sítios de ligação a carboidratos das duas adesinas F1 e/ou OmpA, respectivamente. Para confirmar essa hipótese, mutantes nulos para $\Delta fimA$ (OmpA⁺/ F1⁻) e $\Delta ompA$ (OmpA⁻/F1⁺) foram construídos, e os resultados de adesão e invasão bacteriana foram similares aos obtidos na presença dos inibidores: α -D-manopiranosideo e GlcNAc. Mutante nulo para a proteína YdeR da fimbria F9 $(OmpA^+/F1^+)$, mostrou significativa redução da adesão e invasão bacteriana em células Vero e Huvec ($p \le 0.05$) somente na presença dos inibidores da adesão mediada por F1 e OmpA: α-D-manopiranosideo e GlcNAc, respectivamente. Esses dados sugerem que F9 também contribui para a adesão e invasão de SEPEC. Juntos, nossos dados demonstram que os processos de adesão e invasão de SEPEC são dependentes de OmpA, F1 e F9, as quais podem ser complementares, e devem atuar sinergicamente para a adesão e invasão de SEPEC.

Palavras chave: *Escherichia coli*, Adesinas, proteínas de membrana, sepse, adesão, invasão celular.

х

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	17			
	1.1. Escherichia coli patogênica extra-intestinal (ExPEC)	17			
	1.2. Adesão e invasão bacteriana	18			
	1.2.1. Fatores que contribuem para a adesão e invasão de <i>E. coli</i>	19			
	1.3. Análise proteômica	24			
2. Objetivos					
	2.1. Objetivos gerais	26			
	2.2. Objetivos específicos	26			
3.	Material e métodos	26			
	3.1. Amostras bacterianas	26			
	3.2. Culturas celulares e ensaios de interação bactéria/ células	27			
	3.2.1. Condições de cultivo bacteriano e preparo dos pré-inóculos	27			
	3.2.2. Ensaios de adesão e invasão	27			
	3.3. Estudo de proteínas associadas à membrana externa e potenciais adesinas de SEPEC	30			
	3.3.1. Condições de cultivo bacteriano	31			
	3.3.2. Extração aquosa (Etapa 1)	31			
	3.3.3. Extração não aquosa (Etapa 2)	31			
	3.3.4. Extração não aquosa (Etapa 3)	32			
	3.3.5. Dosagem de proteínas	33			
	3.3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33			
	3.3.7. Identificação de proteínas de SEPEC com potencial para adesinas	34			
	3.4. Técnicas de biologia molecular e bioinformática aplicada	36			
	3.4.1. Obtenção do DNA genômico	36			
	3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	36			
	3.4.4. Bioinformática: estudos in silico	38			
	3.4.5. Deleção gênica	38			
4.	4. Resultados				
	4.1. Adesão e invasão de Escherichia coli associada a sepse humana (SEPEC)	41			
	4.2. Perfis protéicos em SDS-PAGE e extração diferencial de proteínas de membrana	42			

4.3. Identificação de potenciais adesinas de SEPEC por técnicas de proteômica43
4.4. Estudo fenotípico da adesão de SEPEC 46
4.4.1. Inibição da adesão de SEPEC OmpA ⁺ / F1 ⁺ com carboidratos e glicoproteínas
4.5. Estudo fenotípico da invasão de SEPEC 48
4.5.1. Invasão de SEPEC F1 ⁺ / OmpA ⁺
4.6. Estudo fenotípico da adesão e invasão de SEPEC selvagem e mutante para cada gene: <i>omp</i> A, <i>fim</i> A e <i>yde</i> R
4.7. Papel de F9 na adesão e invasão de SEPEC51
4.7.1. Adesão de SEPEC 53 F1 ⁺ / OmpA ⁺ / F9 ⁺ (Selvagem) e SEPEC 53 F1 ⁺ / OmpA ⁺ / F9 ⁻ (Mutante $\Delta y de R$)
4.7.2. Invasão de SEPEC 53 F1 ⁺ / OmpA ⁺ / F9 ⁺ (Selvagem) e SEPEC 53 F1 ⁺ / OmpA ⁺ / F9 ⁻ (Mutante $\Delta y de$ R)
4.8. Caracterização genotípica de SEPEC e estudo das prevalências das adesinas estudadas 56
4.8.1. Análises <i>in silico</i> das seqüências primárias das proteínas OmpA e FimH (adesina da fimbria do tipo 1)
5. Discussão
6. Conclusões
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dedico este trabalho à minha filha Manuela Garcia Conceição

xiv

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me dado saúde e força.

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

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento desta pesquisa.

Agradeço aos meus pais: Roberto e Terezinha e sogra Emília por nunca terem deixado de me dar apoio.

Agradeço meus grandes amigos (as): Stella, Robert, Luiz, Natália, Mayara, Jessica, Karin, Jacqueline, Ancelmo, Ricardo que sempre me auxiliaram em diversos momentos.

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

Agradeço ao professor Dr. Wanderley Dias da Silveira pela colaboração e auxilio nos ensaios de deleção gênica.

Muito obrigado à professora Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, pela doação de antissoros e por sugestões pertinentes para a realização de nosso trabalho.

xvi

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria bacilar da família Enterobacteriaceae, Gram-negativa, pertencente a microbiota intestinal normal do homem, assim como outros animais homeotérmicos (aves e mamíferos) (Croxen e Finlay, 2009). Embora, sejam consideradas membros da microbiota intestinal, *E. coli* podem carrear fatores de virulência (FV's) que as tornam patogênicas. *E. coli* patogênicas, por serem distintas quanto a fatores de virulência, hospedeiros e locais de infecção, classificam-se primeiramente dentro de dois grupos: intestinais (diarreiogênicas) e extra-intestinais (não-diarreiogênicas) (Croxen e Finlay, 2009; Mora *et al.*, 2009).

Existem ao menos seis patotipos bem caracterizados de *E. coli* diarreiogênicas: (1) EPEC (*E. coli* Enteropatogênica) normalmente associadas com diarréia infantil, em países em desenvolvimento; (2) EHEC (*E. coli* Enteroemorrágica) produtora de toxina Shiga (Stx). Tanto EPEC como EHEC são capazes de produzir uma lesão histopatológica na luz intestinal conhecida como "Attaching and effacing - AE", onde ocasionam lesões nas microvilosidades intestinais. EHEC representa um subgrupo dentro de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que produz Stx, porem não possuem todos os genes que codificam AE; (3) ETEC (*E. coli* Enterotoxigênica) produzem toxinas diarreiogênicas, tais como ST (Toxina termo-estável) ou LT (Toxina termo-lábil); (4) EIEC (*E. coli* Entero-invasora) invade células intestinais similar a *Shigella* sp., mas não produzem Stx; (5) EAEC (*E. coli* Enteroagregativa) produzem um padrão de adesão característico em cultura de células chamada de aderência agregativa, e alem disso podem expressar toxinas que são associadas a diarréia persistente em crianças e adultos; (6) DAEC (*E. coli* de adesão difusa), definida assim pelo padrão difuso de aderência em células em cultura e associada a quadros de diarréia, principalmente diarréia infantil (Kaper et al., 2004).

1.1. Escherichia coli patogênica extra-intestinal (ExPEC)

E. coli Patogênica Extra-intestinal (ExPEC) englobam diferentes patotipos dentro da espécie extremamente heterogêneo quanto a fatores de virulência e locais de infecção no hospedeiro. Dentro de ExPEC patotipos são denominados, principalmente de acordo com o

local onde causam infecção, de modo que ExPEC pode ser dividido em: *E. coli* uropatogênica (UPEC) (Kaper et al., 2004), *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC) (Kaper et al., 2004) e *E. coli* associada a sepse (SEPEC) (Johnson e Russo, 2001). Alem disso, embora o termo ExPEC tenha sido proposto para a classificação de isolados em seres humanos (Kaper et al. 2004), ExPEC também tem sido as principais causas de infecções extra-intestinais em animais, como aves domésticas. *E. coli* patogênica aviária, ou APEC são freqüentemente associadas a infecções extra-intestinais em aves, como infecções de trato respiratório e sepse (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Barners et al., 2003). Segundo Moulin-Schouleur et al. (2007) amostras ExPEC humanas e aviárias são sorológica e filogeneticamente similares, sugerindo que APEC englobam cepas ExPEC humanas.

E. coli podem ser classificadas dentro de 4 grupos filogenéticos, com base na coleção de referência de *E. coli* ECOR: A, B1, B2 e D (Clermont et al., 2000). Segundo esses autores os grupos B2 e D representam os clones mais virulentos de *E. coli* e são geralmente associados a ExPEC humanas. Segundo Sannes et al. (2004); Martínez et al. (2006); Jauréguy et al. (2007); Bukh et al. (2009) e Santos et al. (2013), *E. coli* dos grupos ECOR: B2 e D representam os principais clones virulentos de ExPEC isolados de bacteremias e/ou sepse.

Por definição, bacteremias são condições onde ocorrem bactérias na corrente circulatória, podendo ou não indicar a presença de um foco de doença (Salles et al. 1999). No sangue, pode decorrer o quadro clínico da sepse que indica um estado em que as bactérias estão causando infecções sistêmicas no hospedeiro, e muitas vezes podem levar a óbito (Mokady et al., 2004). Por sua vez, sepse em seres humanos ocorrem principalmente por via urinária, ou ascendente, sendo os rins e o endotélio renal as principais fontes de propagação da bactéria pelo sistema sanguíneo (Kaper et al., 2004 e Mokady et al., 2005).

1.2. Adesão e invasão bacteriana

A adesão e colonização de tecidos extra-intestinais por *E. coli* representam as principais etapas nas infecções causadas por esse microrganismo em seres humanos

(Johnson e Russo, 2001; Kaper et al., 2004; Mokady et al., 2005). Fatores de virulência bacteriana, também conhecidas por adesinas, são moléculas dispostas na superfície do patógeno capazes de interagir com receptores específicos na superfície da célula hospedeira e promover a adesão bacteriana durante a infecção, colonização e persistência do agente infeccioso (Johnson e Russo, 2000; Kaper et al., 2004).

Segundo Kochut e Dersch (2013) há duas vias de invasão bacteriana em células eucarióticas: (1) *Trigger mechanism* (ou mecanismo de gatilho), onde proteínas efetoras são ejetadas no interior da célula hospedeira, levando a desarranjos do citoesqueleto celular provocando a entrada da bactéria no interior celular; (2) *Zipper mechanism* (mecanismo de zíper), onde moléculas na superfície bacteriana se ligam a receptores dispostos na membrana citoplasmática da célula hospedeira, ativam vias intra-celulares que provocam rearranjos do citoesqueleto e engolfam a bactéria aderida. Utilizam-se do mecanismo de gatilho, bactérias como *Shigella* spp. e *Salmonella* spp.; e mecanismo de zíper: *E. coli, Streptococcus* spp., *Listeria* sp., *Yersinia* sp., dentre outras.

1.2.1. Fatores que contribuem para a adesão e invasão de E. coli

Fimbrias são longas estruturas que se estendem da superfície de muitas bactérias e medeiam diversas funções como principalmente adesão e formação de biofilme (Wurpel et al., 2013). As adesinas fimbriais estão freqüentemente dispostas no topo da fimbria, reconhecem e se ligam a receptores específicos e por isso podem estar associadas ao tropismo da bactéria por determinado tipo celular, ou tecido (Proft e Baker, 2009). Fimbrias podem ser expressas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por diferentes vias e sistema de secreção bacteriana (Proft e Baker, 2009). A via mais comum pelo qual elas são dispostas na superfície de bactérias Gram-negativas é via "*Chaperone-usher -* CU" (Secreção tipo II), seguida da polimerização e montagem das subunidades fimbriais (Kline et al., 2009). A biogênese fimbrial via *Chaperone-usher* requer uma chaperona periplasmática e uma proteína chamada ''*Usher*'' que atravessa a membrana externa e da sustentação ou suporte para a montagem das outras subunidades fimbriais (Wurpel et al., 2013). Em algumas fimbrias, como por exemplo, fimbria do tipo 1, sobre a proteína *Usher*

são polimerizadas repetições de uma subunidade estrutural chamada de subunidade maior, formando corpo da fimbria, seguida por outras proteínas, chamadas de subunidades menores que precedem a adesina fimbrial (Wurpel et al., 2013).

O tipo mais comum deste tipo de adesina é a fimbria do tipo 1 - F1 (Wurpel et al., 2012). F1 é caracterizada por sua afinidade de ligação a manose, e representa uma das fimbrias mais comuns de *E. coli* (Schembri et al., 2000). F1 é composta de repetições de uma proteína, chamada de FimA (sub-unidade maior) que constitui o filamento da fimbria. Na extremidade do filamento formado por FimA, duas proteínas: FimF e FimG, servem de suporte a lectina fimbrial que se encontra no topo, a proteína FimH (Figura 1) (Sperling et al., 2006). No cromossomo bacteriano os componentes fimbriais assim como a maquinaria envolvida na sua síntese são codificadas pelo operon *fim* composto por 8 genes, *fim*ABCDEFGH (Mol e Oudega, 1996).



Figura 1 – Diagrama esquemático da estrutura da fimbria do tipo 1 (F1). (http://2008.igem.org/Team:NYMU-Taipei/Project/Attachment)

F1 é comum a cepas de *E. coli* comensais e em diferentes patotipos de *E. coli*, porem representa um importante fator de virulência a cepas ExPEC. Segundo Sokurenko et al. (1997) aproximadamente 80% de isolados fecais de *E. coli* a adesina FimH possuem afinidade a receptores tri-manose, ao contrário de isolados de trato urinário, onde cerca de 70% possuíam mutações dentro do gene *fim*H associadas a habilidade de reconhecer receptores mono-manosilados.

Segundo Schembri et al. (2000) ocorrem naturalmente variantes no gene *fim*H selecionadas por sua habilidade de reconhecer receptores específicos, associados principalmente a adaptação de *E. coli* patogênica ao ambiente extra-intestinal, como o trato urinário. Dias et al. (2010) descreveram *fim*H variantes de isolados clínicos de *E. coli*, e propuseram que tais variações podem ser distintas quanto a polimorfismos de nucleotídeos simples (Single-Nucleotide Polymorphisms), sendo úteis na distinção *E. coli* comensais e ExPEC.

A afinidade entre as variantes de FimH para os alvos manosilados, podem ser alterados de acordo com a estrutura primária da proteína (Duncan et al., 2005). Segundo Sokurenko et al. (1997) e Duncan et al. (2005), embora F1 seja comum em *E. coli* patogênicas ou não, mutações pontuais dentro do gene *fim*H levam a alterações no peptídeo/proteína associados a sua função biológica como um fator de virulência. De acordo com Sokurenko et al. (1997), a alteração em único aminoácido na região de interação de FimH/ manose podem alterar o fenótipo de ligação tri-manose para um fenótipo mono-manose. Além disso, alterações adicionais podem promover o fortalecimento da ligação mono-manose, possivelmente aumentando a urovirulência, e também conferindo ligação ao colágeno do tipo IV associado a meningo-virulência (Pouttu et al., 1999).

F1 de *E. coli* uropatogênica (UPEC) é fundamental para a adesão bacteriana ao uroepitélio (Wu et al., 1996). Segundo Finlay e Cossart (1997) e Martinez et al. (2000) a expressão de F1 por UPEC aumenta a colonização bacteriana e promove a invasão das células da bexiga.

F9 representa uma fimbria estruturalmente similar a F1, e foi caracterizada recentemente por Low et al. (2006) e Ullet et al. (2007). Seis genes foram preditos como subunidades fimbriais devido às similaridades entre nucleotídeos com os genes fim de F1: *fml*A (similar a *fim*A), *fml*B (similar a *fim*C), *fml*C (similar a *fim*D), *yde*R (similar a *fim*G), *yde*S (similar a *fim*F), *fml*D (similar a *fim*H) (Low et al., 2006; Ullet et al., 2007). F9 foi descrita anteriormente em *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7) (Low et al., 2006) e uropatogênica (CFT073) (Ullet et al., 2007), e estudos genômicos em diferentes linhagens de *E. coli* K-12 mostraram que o grupo de genes preditos que constituem a fimbria possuem mutações e deleções, que inviabilizam a expressão de F9 em *E. coli* K12 (Korea et al., 2010). Embora F9 e seus substratos sejam pouco conhecidos, a ligação de F9 a receptores específicos de células endoteliais pode também contribuir para a invasão de SEPEC.

Alem de fimbrias, proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Proteins*) também representam moléculas na superfície bacteriana, na interface entre o patógeno e a célula hospedeira (Molloy et al. 1998; Molloy et al., 2000). Dentro de OMP's, a proteína de membrana A (OmpA) representa a maior OMP de *E. coli* (Smith et al., 2007).

OmpA de *E. coli* é uma proteína homóloga a Opa de *Neisseria meningitidis*, um importante agente causador de sepsis e meningite em humanos (Dehio et al., 1998). Segundo autores como Prasadarao et al. (1996a); Kim (2000), Datta et al. (2003); Power et al. (2006) tanto OmpA de *E. coli* associada a meningite neonatal – NMEC, quanto Opa de *N. meningitidis* (Dehio et al., 1998) foram associadas a adesão e invasão de células endoteliais humanas. OmpA possui em sua porção N-terminal domínios transmembrânicos compostos por oito folhas β em paralelo com quatro *loops* hidrofílicos voltados para a parte externa (Kim, 2000) (Figura 3). Segundo Prasadarao et al. (1996a) a adesão e invasão de NMEC ocorre por interações moleculares entre OmpA e epítopos GlcNAc β 1-4GlcNAc presentes em uma glicoproteína de superfície específica de células Huvec). Segundo esses autores essa interação seria o principal fator associado ao tropismo de NMEC ao endotélio cerebral e não ao sistêmico. Epítopos GlcNAc β 1-4GlcNAc estão presentes também em outras glicoproteínas, e em diferentes linhagens celulares, porem, segundo Prasadarao et al.

(1996b) a ligação de Omp A_{NMEC} a proteína Ecgp deve ser favorecida pela forma como GlcNAc β 1-4GlcNAc estão dispostos na glicoproteína Ecgp.



Figura 2 - Proteína de membrana A (OmpA). (a) Parte da estrutural de OmpA, mostrando os 4 loops hidrofílicos voltados para a parte externa da parede bacteriana (Kim, 2001). (b) Estrutura protéica mostrando como OmpA está disposta na parede bacteriana. (Fonte: Smith et al., 2007)

Embora OmpA tenha sido descrita como uma importante adesina/invasina de NMEC, Torres e Kaper (2003) mostraram que a função de OmpA como uma adesina não é exclusiva deste patotipo e demonstraram que OmpA também contribui para a adesão de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC O157:H7) em células HeLa (Adenocarcinoma humano) e Caco2 (Adenocarcinoma de cólon humano). Em seguida, Datta e colaboradores (2003) demonstraram que duas regiões de OmpA (loops 1 e 2) correspondem as regiões de interação entre a bactéria e a célula hospedeira, e em 2006, Power e colaboradores publicaram que OmpA possui ao menos dois alelos, *omp*A1 e *omp*A2. Segundo Power et al. (2006) a principal diferença entre esses dois alelos é seqüência de aminoácidos que constituem os *loops* 2 e 3 da proteína. Interessantemente, o *loop* 2 representa uma das porções da "adesina" de OmpA (Datta et al., 2003), e o *loop* 3 foi então sugerido por Power et al. (2006) como uma das porções da "invasina" de OmpA2 (figura 3). Muito embora diferenças nos *loops* 1 e 2 estejam associados a *E. coli* invasivas e não invasivas, não está claro se Ecgp age como receptor de OmpA também nessas linhagens celulares, ou se variantes de *omp*A devam influenciar na capacidade adesiva/ invasiva de determinados patotipos.

1.3. Análise proteômica

As proteínas são biomoléculas responsáveis por desempenhar as funções biológicas. Com o desenvolvimento das técnicas de seqüenciamento de DNA e genomas completos, grande quantidade informação foi gerada e atualmente encontra-se disponível em banco de dados públicos. Porem apesar da grande quantidade de informação acumulada, poucas foram as respostas biológicas a respeito de como as proteínas desempenham as suas funções biológicas (Aebersold e Mann, 2003). Por definição proteôma é o conjunto total de proteínas expressas pelo genoma de um determinado organismo ou tipo celular (Aebersold e Mann, 2003), mas devido a dinâmica na expressão de proteínas de um organismo, tecido ou cultivo celular, estar sujeita a diversas condições, como ambientais e desenvolvimentais, o estudo proteômico pode ser dividido ou direcionado estritamente as condições de interesse, com o objetivo de uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos (Aebersold, 2003).

Existem diferentes formas de se estudar o conjunto de proteínas de um determinado sistema biológico. A abordagem mais clássica é o estudo da expressão global de proteínas e envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas, geralmente resolvidos por eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massas (Aebersold, 2003). O resultado final deste tipo de análise leva a uma descrição ou catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, e alem disso, fornece informações úteis sobre as proteínas como ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância e modificações pós-traducionais (Pandey e Mann, 2000).

A proteômica representa a ferramenta para o estudo de complexos protéicos e trata-se de uma etapa essencial no estudo da genômica funcional (Zhen et al., 2007). Para o uso da

proteômica, há dois métodos clássicos: (1) separação em géis de poliacrilamida (1D-Page ou 2D-Page), e (2) identificação por espectrometria de massas (MS) (Xu et al., 2006). A separação em géis 2D-Page são úteis, pois fornecem informações importantes, como ponto isoelétrico (PI) e massa molecular (Da), porem estudos tem demonstrado que apenas as proteínas mais abundantes da célula podem ser identificadas (Haynes e Yates, 2000). Nesse ponto, géis SDS-Page (1D Page) podem ter vantagens sobre 2D-Page pois junto a sensibilidade das analises MS podem identificar proteínas pouco expressas em soluções complexas (Haynes e Yates, 2000).

A espectrometria de massas, utilizada para a identificação da(s) proteína(s) pode ser dividias em 4 passos: (1) ionização das moléculas, (2) separação dos íons, (3) conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, e (4) medição dos feixes elétricos. Durante a ionização, as moléculas da amostra são convertidas em íons em fase gasosa e existem dois processos de ionização capazes de gerar íons a partir de proteínas e peptídeos. Esses processos são "ionização por dissociação da matriz por lazer" (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), e pulverização de elétrons em microcapilares sob alta pressão atmosférica e alta voltagem (ESI – <u>Electron Spray Ionization</u>) (Mann et al., 2001). O spray gerado no processo ESI leva a formação de gotículas carregadas formadas pela diferença de potencial entre um tubo capilar e um eletrodo que circunda a saída do capilar. Na saída do capilar as gotículas atravessam uma câmara contendo um gás secante que fazem as gotículas se tornarem cada vez menores enquanto são ejetadas para a fase gasosa (Riveros et al., 2010). Em seguida os íons são separados de acordo com suas cargas previamente geradas (razão massa/ carga, ou m/z), e o analisador de massas mede a aceleração das partículas e a relação do tempo necessário para atingir o detector (TOF – Time of Flight) (James, 1997). Enfim, os dados gerados são interpretados por consultas a banco de dados públicos feito por programas de informática, por exemplo: MASCOT.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve por objetivo a identificação de potenciais adesinas de *Escherichia coli* associada à sepse humana (SEPEC).

2.2. Objetivos específicos

 Identificação de determinantes bacterianos associados à adesão e invasão de células Vero (Rim de macaco verde africano) e Huvec (Veia umbilical humana);

- Estudo molecular e in silico de potenciais adesinas de SEPEC;

- Estudo funcional da adesão e invasão bacteriana;

3. Material e métodos

3.1. Amostras bacterianas

Quarenta e nove (49) amostras de *Escherichia coli* associada à sepse humana (SEPEC) foram inicialmente utilizadas neste trabalho. Todas as amostras foram isoladas de pacientes clinicamente diagnosticados com sepse, obtidos por hemocultura entre os anos de 1998 e 2001 pelo Laboratório de Patologia Clínica (Seção de Microbiologia Clínica) – HC – Unicamp (Ananias e Yano, 2008).

Cepas de *E. coli* padrões utilizadas no estudo são listadas na tabela 1. Todas as cepas SEPEC e linhagens utilizadas encontram-se devidamente estocadas no Laboratório de Fatores de Virulência em Bactérias – Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Unicamp.

Tabela 1 Linhagens de *E. coli* utilizadas como controles positivos e negativos de ensaios genotípicos.

Linhagens	Características fenotípicas			
	Adesão	Invasão		
HB 101	Negativo	Negativo		
K12.C600	Negativa (Na presença de α-D-manopiranosideo)	Negativo		
ORN 115	Negativa (Na presença de α -D-manopiranosideo)	Negativo		
(EHEC) O157:H7 str. EDL 933	Positivo	Negativo		
(NMEC) 018:K1:H7	Positivo	Positivo		
(UPEC) O4:K6 str. J96	Positivo	Positivo		
FHFC: F cali enterohemorrágica: NMFC: F cali associada a meningite neonata				

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; NMEC: *E. coli* associada a meningite neonatal; UPEC: *E. coli* uropatogênica.

3.2. Culturas celulares e ensaios de interação bactéria/ células

As linhagens celulares Vero e Huvec foram cultivadas em Meio Essencial de Eagle (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab) sob atmosfera de 5% de CO_2 por 36/48 horas (período de expansão). As células foram transferidas para placas de 96 ou 24 orifícios, de acordo com a necessidade de cada ensaio.

3.2.1. Condições de cultivo bacteriano e preparo dos pré-inóculos

SEPEC e as cepas controle foram cultivadas em meio TSB (Trypticase Soy Broth) por 16-18h (*overnight*). Em seguida, 1mL do crescimento foi centrifugado a 6000XG por 10 min. a 4°C. O *pellet* bacteriano foi lavado 2 vezes em PBS estéril, e os pré-inóculos foram ajustados em espectrofotômetro OD_{600} de 0,4 em PBS estéril (+/- 0,1; ou aproximadamente 10^8 bactérias/mL).

3.2.2. Ensaios de adesão e invasão

As células foram transferidas para placas de 96 ou 24 orifícios de acordo com cada ensaio de adesão ou invasão. Para todos os ensaios utilizou-se monocamada confluente. Brevemente, as células foram infectadas com o pré-inóculos (item anterior), incubadas por 30 minutos a 37°C em condições estáticas (tempo de infecção). Em seguida, os orifícios foram lavados três vezes com PBS estéril para remover as bactérias que não aderiram e foram acrescentados MEM em cada orifício. Em seguida, as placas foram incubadas novamente durante três horas sob mesmas condições (tempo de multiplicação) (Scaletsky et al., 1984). Nos ensaios de invasão bacteriana, a monocamada celular foi novamente incubada com MEM acrescida de $100\mu g/mL$ de gentamicina para inviazilizar toda bactéria extra-celular e se preservar as bactérias no interior celular. Após esse período, os orifícios foram lavados 6 vezes com PBS estéril e prosseguiu-se para cada metodologia, conforme descrito abaixo.

3.2.2.1. Microscopia eletrônica de transmissão

O ensaio de microscopia eletrônica de transmissão foi realizado somente com células Vero, em placas de 24 orifícios sob lamínulas de vidro. Neste ensaio foram analisadas lamínulas do ensaio de adesão e invasão. Após o tempo de multiplicação (adesão) ou com antibióticos (invasão), as lamínulas contendo as monocamadas celulares foram fixadas por 30 minutos em solução fixadora (2% paraformaldeído (Sigma, St Louis, USA) e 2% de glutaraldeído (Electron Microscope Science, USA) em 10 mM tampão cacodilato, pH 7.4). As lamínulas foram desidratadas através de um gradiente em etanol e subseqüentemente imersas em resina propileno óxido/Epon s812 (Electron Microscope Science) (media de 1:1 e 3:1, respectivamente) por 6 horas antes da administração da resina pura (overnight). Após este processo, a resina foi mantida a 60°C por 72h para polimerização . As seções ultra finas, obtidas em ultramicrótomo (Leika UCT, Austria), foram contrastadas duas vezes com 2% de acetato de uranila (Fluka, Suíça) 0.5% de citrato de chumbo antes da observação e documentação em microscópio eletrônico de transmissão (LEO-Schot Zeiss EM906), operando em tensão aceleradora de 80 kV.

Para análise por fluorescência, o ensaio de adesão foi realizado em culturas celulares cultivadas em placas de 24 orifícios, sobre lamínulas de vidro. Após o tempo de multiplicação, as células foram lavadas 6 vezes com PBS estéril e fixadas com paraformoldeído (1,5%) por 15 min. Em seguida adicionou-se 100µL de tween 80 por 15 min. seguido de duas lavagens com PBS. Após as lavagens, adicionou-se 100µL de TRITC (Tetrametil rodamina isotiocianato) e incubou-se a placa em ausência de luz por 15 min. As células foram lavadas duas vezes, por 5 min., com PBS e adicionou-se DAPI (4,6 diamidino-2-fenilindole) por 15 minutos. Foi realizada montagem das lâminas, as quais foram analisadas em microscópio de fluorescência.

3.2.2.3. Inibição da adesão e invasão

Para o estudo funcional da adesão e invasão de SEPEC, foram realizados ensaios de inibição da adesão e invasão, utilizando-se carboidratos como antagonistas: α -D-manopiranosideo (antagonista de F1, segundo Abgottspon et al., 2010); e polímeros 1,4 GlcNAc¹, antagonista de OmpA (Prassarao et al., 1996). Utilizou-se também glicoproteínas obtidas de células Vero e Huvec.

3.2.2.3.1. Adesão bacteriana (quantitativo)

Primeiramente as monocamadas foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e incubadas com 500µL dos pré-inóculos por 30 minutos a 37°C em condições estáticas (tempo de infecção). Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril para remover as bactérias que não aderiram e foram acrescentados 500mL de MEM. As placas foram incubadas por 3 horas sob as mesmas condições (tempo de multiplicação). Após este período, a monocamada celular foi lavada 6 vezes com PBS estéril e lisada com Triton X-

¹ Chito-oligossacarídeos foram obtidos a partir da hidrólise da quitina de camarão.

100 (0,1%) gelado, para liberação das bactérias aderentes. A quantificação de bactérias aderentes foi realizada por contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) em placas de Agar MacConkey por diluição seriada, conforme Barbosa et al. (1995). Os resultados quantitativos da adesão bacteriana foram comparados entre cada replicata biológica por teste-t (*student*) através do software GraphPad Prism versão 5 para Windows (p<0,05).

3.2.2.3.2. Invasão bacteriana (quantitativo)

O teste de invasão das amostras de SEPEC foi realizado como uma extensão do ensaio de adesão. Este ensaio foi realizado em placas de 96 orifícios, de acordo com cada ocasião. Após 3 horas de multiplicação, a monocamada celular foi lavada 3 vezes com PBS estéril, e acrescentou-se novo meio cultura acrescido de 100μ g/mL de gentamicina para inviabilizar qualquer bactéria extracelular. A microplaca foi incubada por 2 horas a 37°C. Após este período, a monocamada celular foi lavada 6 vezes com PBS estéril e lisada com Triton X-100 (0,1%) gelado, para liberação das bactérias intracelulares. A quantificação de bactérias intracelulares foi realizada por contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) em placas de Agar MacConkey por diluição seriada, conforme Barbosa et al. (1995). Os resultados quantitativos da adesão bacteriana foram comparados entre cada replicata biológica por teste-t (*student*) através do software GraphPad Prism versão 5 para Windows (p<0,05).

3.3. Estudo de proteínas associadas à membrana externa e potenciais adesinas de SEPEC

Uma amostra SEPEC (Amostra 53, sorogrupo O2) foi escolhida dentro de nossa coleção para o estudo de potenciais adesinas. Utilizou-se *E. coli* HB 101, como controle de bactéria não aderente.

3.3.1. Condições de cultivo bacteriano

A amostra SEPEC foi primeiramente cultivada em Agar MacConkey e uma colônia foi repassada para pré-inóculos com 3mL de meio TSB, os quais foram cultivados a 37°C sob agitação (150rpm/min) até atingir a turvação medida em OD₆₀₀ igual a 0,1 (+/- 0,01). Em seguida, os pré-inóculos foram repassados para Erlenmayers com 500mL do mesmo meio, e cultivados por 24 horas a 37°C sob agitação (150rpm) (Resch et al. 2006). Os crescimentos bacterianos foram centrifugados (6000XG, 15 min., 4°C) e os *pellets* foram lavados 3 vezes em tampão Tris (40mM, pH 9,5). As bactérias lavadas foram submetidas a processos diferenciais de extração de proteínas de membrana externa (*Outer membrane proteins* – OMP's), conforme descrito abaixo.

3.3.2. Extração aquosa (Etapa 1)

SEPEC foram re-suspensas em tampão Tris-base (40mM, pH 9,5). Em seguida, a extração de proteínas associadas a membrana externa foi realizada em agitador (Polytron) durante 6 minutos em banho de gelo (Girón et al., 1993, com modificações). O extrato obtido foi centrifugado a 10000XG por 15 min. a 4°C e o sobrenadante obtido foi coletado (Extrato 1). O *pellet* resultante foi utilizado, foi lavado duas vezes com tampão Tris-base (40mM, pH 9,5), liofilizado e liofilizado. Do extrato 1 partiram-se duas alíquotas, sendo que: (1) o extrato bruto foi utilizado; (2) o extrato foi concentrado em colunas Vivaspin (GE Healthcare) com poros de 3KDa (*Cut off*).

3.3.3. Extração não aquosa (Etapa 2)

O *pellet* liofilizado (item anterior) foi tratado com solução de extração 8M uréia, 4% p/v CHAPS e 100mM DTT, durante 15 min. Em seguida, os extratos foram submetidos a tratamento com ultrassom (ampl. 30% por 2min.) em banho de gelo. O extrato obtido foi centrifugado a 10000XG por 15 min. a 4°C, o sobrenadante foi coletado e denominado como "extrato 2". O material insolúvel obtido nesta etapa (*pellet*) foi lavado 2X em tampão Tris-base (40mM, pH 9,5) e liofilizado (Molloy et al., 1998).

3.3.4. Extração não aquosa (Etapa 3)

O material insolúvel obtido no passo anterior foi tratado com 7M uréia, 2M tiouréia, 2% p/v CHAPS, 2% p/v SB 3-10 e 2mM TBP, durante 15 min. Em seguida, os extratos foram submetidos a tratamento com ultrassom (ampl. 30% por 2min.) em banho de gelo e o extrato obtido foi denominado como "extrato 3" (Molloy et al., 1998). O fluxograma da extração diferencial de proteínas de membrana externa pode ser visto na figura abaixo.



Figura 3 - Fluxograma da extração diferencial de proteínas de membrana externa de SEPEC.

3.3.5. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas de cada extrato foi realizada utilizando o kit de reagentes de Bradford (Bio-Rad). Os resultados foram comparados a curva padrão obtida com quantidades conhecidas de albumina de soro bovino (BSA), sendo essas quantidades: $2\mu g$, $4\mu g$, $6\mu g$, $8\mu g$, $10\mu g$ e $12\mu g$, segundo Bradford (1976).

3.3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970), com gel de concentração a 4% e gel de resolução a 13 ou 15%. Os extratos protéicos (50µg)

foram combinadas com o tampão de amostra (v/v) (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% de glicerol; 5% de 2-mercaptoetanol; 0,02% de Azul de Bromofenol) e fervidas por 5min. A eletroforese foi conduzida em duas etapas: 80V constantes por 30 min.; seguido de 100V por 190 min. Após a eletroforese, as proteínas foram visualizadas pela coloração do gel em solução de *Coomassie blue* R-250 (Sigma Aldrich).

3.3.7. Identificação de proteínas de SEPEC com potencial para adesinas

Interações entre OMP's de SEPEC e glicoproteínas celulares (Vero e/ou Huvec) foram baseadas na interação biotina/ streptavidina, segundo Cole e Ashman (1987) e *blotting* de acordo com Hartmann et al. (2010).

3.3.7.1. Biotinilação de glicoproteínas de superfície celular

A biotinilação de glicoproteínas de superfície de células Vero e Huvec foi realizada conforme descrito por Cole e Ashman (1987). Inicialmente, as monocamadas confluentes de células Vero e Huvec foram obtidas em placas de 150 x 20mm. Em seguida, as monocamadas celulares foram lavadas duas vezes com PBS estéril e re-suspensas por raspagem em PBS, e lavadas 2 vezes por centrifugação a 2000XG por 2 min a 4°C. Após a lavagem, as células foram tratadas em PBS contendo 10mg/mL de biotina (EZ-link sulfo-NHS-LC-biotin) e incubadas por 1 hora a 37°C (biotinilação). Para remoção do excesso de biotina, as células foram lavadas 3vezes com PBS sob as mesmas condições e submetidas a tratamento com ultrassom (ampl. 20% por 2min.) em banho de gelo. Os extratos contendo as glicoproteínas biotiniladas foram separados do *pellet* insolúvel por centrifugação a 10.000XG por 10 min. a 4°C. Em seguida, o excesso de biotina dos extratos foi removido em coluna *desalting* (ZebaTM Spin Desalting Column) e as proteínas celulares biotiniladas foram coletadas e armazenadas a -20°C até o momento do uso, em ensaios de *blotting*. Foram também preparados extratos de glicoproteínas celulares não biotiniladas.

3.3.7.2. Ensaios de blotting para detecção de OMP's de SEPEC com afinidade de ligação com glicoproteínas celulares biotiniladas

Os extratos de OMP obtidos em géis SDS-PAGE foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Bio-rad). As membranas foram bloqueadas com solução TBS-T (Tampão Tris-Salina, suplementado com 0,1% de *tween*-20 e 5% de BSA) por 1 hora a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas overnight (16-18 horas) em solução contendo extrato de proteínas das células Vero ou Huvec, na proporção 1:3000 em PBS suplementado com 0,02% de tween-20 e 0,5% BSA (PBS-T-BSA). Após esse período, as membranas foram lavadas três vezes, por 5 min., com TBS-T e em seguida incubada por 1h com streptavidina conjugada com peroxidase 1:1000 em PBS, conforme recomendações do fabricante (GE Healthcare). OMP's com potencial para adesinas foram detectadas por quimioluminescência.

3.3.7.3. Identificação por espectrometria de massas de OMP blot-positivas

Bandas *blot*-positivas foram identificadas nos respectivos géis, cortadas e processadas como descrito por Shevchenko et al. (1996). Brevemente, a banda protéica foi digerida com 20ng/ μ L de tripsina (Promega Corp., Madison, WI) em 50mM de NH₄HCOOH, pH 8.0. A reação foi realizada por 16-18h (overnight) a 30°C. Os peptídeos foram extraídos do gel por solução de 50% de acetonitrila, contendo 5.0% de ácido trifluoroacéptico, para subseqüente análise.

As análises dos peptídeos foram realizadas por ESI-Q-Tof (*Electrospray Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometer* - ESI-Q-Tof, Waters Corp., Milford, MA). As amostras foram re-suspensas em 0,1% de ácido fórmico e aplicados em sistema LC–MS/MS (AcquityUPLC-ESI-Q-Tof,WatersCorp.) para a identificação das proteínas. O sistema foi continuamente calibrado com ácido fosfórico em um fluxo médio de 0,2µL/min, e os peptídeos foram eluídos da coluna com fluxo de 0,6µL/min. As analises em LC–MS/MS foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional Brasileiro de Biociências, ABTLuS-CNPEM (Campinas, São Paulo, Brasil). A

interpretação dos espectros de massas, dedução das seqüências de peptídeos e identificação das proteínas foram realizadas pelo programa MASCOT (http://www.matrixscience.com/).

3.4. Técnicas de biologia molecular e bioinformática aplicada

3.4.1. Obtenção do DNA genômico

A extração do DNA bacteriano foi realizada conforme Blanco et al., 1997, com modificações. As amostras foram inicialmente pré-cultivadas em meio TSB (Tryptic Soy Broth) a 37°C por 18 horas e, em seguida, foram semeadas em placas contendo TSA (Trypticase Soy Agar) e incubadas a 37°C por 24h para a obtenção de crescimento confluente. Uma alçada foi suspensa em 500 μ L de água deionizada estéril e fervida a 100°C por 10 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10min. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante, contendo o DNA de cada amostra, foi aliquotado e armazenado a -20°C.

3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para cada gene, conforme descrito abaixo. Para as reações foram utilizados kits (Fermentas) segundo recomendações do fabricante. Resumidamente, cada reação foi realizada em um volume total de 30µl, contendo 150ng de cada dNTP, Tampão 10X (10mM Tris-HCl com pH 8,3 e 50mM KCl), 50mM MgCl2 e Taq DNA polimerase 1U.

A caracterização filogenética de SEPEC foi realizada de acordo com o proposto por Clermont et al. (2000). As seqüências dos iniciadores utilizados estão listadas na tabela 3.
Gene	Descrição	Sequencia (5'-3')	Produto da reação (pb)
1	Receptor de membrana (Sistema	GACGAACCAACGGTCAGGAT	270
chuA	de captação de ferro) de <i>E. coli</i> Entero-hemorrágica (EHEC)	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279
•	Drotoína Uinatática	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211
ујаА	Proteina Hipotetica	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211
	Fragmento anônimo de DNA	GAGTAATGTCGGGGGCATTCA	
tspE4.C2	específico para <i>E. coli</i> associado a meningite neonatal (NMEC)	CGCGCCAACAAAGTATTACG	152

Tabela 2 - Iniciadores propostos por Clermont e colaboradores (2000) para caracterização filogenética de *E. coli* (ECOR).

Os iniciadores utilizados para estudos moleculares, genotipagem de nossa coleção SEPEC (estudo de prevalência) e sequenciamento para estudos *in silico* são listados abaixo:

	Gene	Descrição	Sequencia (5'-3')	Produto da reação (pb)		
ompA	ompA *	Proteína de membrana A	TCATGGCGTATTTTGGATGA CTTAAGCTTGCGGCTGAGTT	1034		
fl	fimA	Subunidade maior da fimbria do tipo 1	TACAGAACGACTGCCCATGT CGTAATGACGTCCCTGAACC	631		
	fim H *	Adesina da fimbria do tipo 1	GGCCAAAACCTGGTCGTAGAT GCGCTTTGTTTATGCCAGAT	1023		
<i>f</i> 9	fmlA	Subunidade maior da fimbria do tipo 9	CTTGTTTTATAAGCAATAACAGAATGA CGTAGCCATGCCACACAC	532		
	fmlB	Subunidade da fimbriado tipo 9 (Chaperona)	CAAACTACGCGTACCCCCTA TGCATGGTTGCCTTAATACG	456		
	fmlC	Subunidade da fimbriado tipo 9 (Usher)	AAAAGAGGCAGACGGCAGTA GCCATAAACCCCCGATAGAT	652		
	ydeR/S	Subunidades menores da fimbria do tipo9	TGAACCAGCAGACAGCAATC TGCAGATTGCGCGTATAAAG	932		
	fmlD	Adesina da fimbria do tipo 9	ATCGAGGCGCTAATCAATGT ATGACTGACTGGACGGTTCC	401		
Todos BLAST	os produto [n	os da PCR foram seqüenc	iados e confirmados quanto a ORF corresp	ondente por		

Tabela 3 - Iniciadores desenhados para genotipagem das amostras para *omp*A, *f*1 e *f*9.

BLASTn http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC= blasthome * Para as análises das seqüências de pepídeos das proteínas, os iniciadores *omp*A e *fim*H foram desenhados *upstream* e *downstream* ao gene, de modo que os produtos das reações representam o gene por completo.

3.4.4. Bioinformática: estudos in silico

O estudo in silico foi realizado apenas com a proteína OmpA e FimH (Subunidade da fimbria do tipo 1 com função de adesina). Esse estudo foi realizado a partir das següências de DNA obtidas por PCR (Seção 3.4.3.). A fim de evitar possíveis erros da PCR o seqüenciamento foi realizado em duplicata, sendo que em cada replicata utilizou-se apenas 1 dos primers (foward ou reverse) descritos na tabela 4 (Ver iniciadores marcados com "*"). Na análise computacional, foram analisadas as seqüências de peptídeos deduzidas a partir das següências de nucleotídeos. A matriz de leitura da següencia de DNA correta, ou CDS (complete coding sequence) foram obtidas no banco de dados NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e ferramentas disponíveis no mesmo banco, como ORF Finder (Open Reading Frame Finder. disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html). Todos os alinhamentos e tradução in silico foram pelo programa Mega software versão 5.2 para Windows. Para estudos comparativos com banco de dados públicos utilizou-se ferramenta NCBI а Blastp. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE TYPE=BlastSearch& LINK LOC=blasthome).

3.4.5. Deleção gênica

A deleção gênica foi realizada com o objetivo de se verificar fenotipicamente a influência de cada gene/ proteína identificada na adesão e invasão bacteriana. As deleções no cromossomo bacteriano foram realizados através de mutagênese λ *red* (Datsenko e Wanner, 2000). Brevemente, SEPEC foram transformadas, por eletroporação com o plasmídeo pKD46 (plasmídeo helper). Em seguida, carreando o plasmídeo, SEPEC

pKD46⁺foi crescida em meio TSB suplementado com 200mM de L-arabinose e $10\mu g/mL$ de ampicilina, a 29°C sob agitação (150rpm) até OD₆₀₀ atingir a turvação de 0,4 (Fase Logarítmica). SEPEC pKD46⁺ foram novamente eletroporadas e transformadas com produtos da PCR contendo um cassete de resistência ao Cloranfenicol (amplificado por PCR a partir do plasmideo pKD3) flanqueado por 40 pares de base *upstream* e *downstream* ao gene de interesse. A bactéria mutante foi selecionada por semeadura em ágar MacConkey suplementado com cloranfenicol. Para confirmar a inativação do gene de interesse, foi realizada PCR usando iniciadores confirmatórios. Os iniciadores utilizados são descritos na tabela abaixo:

Gene	Objetivo		Sequencia (5'-3')
	Deleção	F	CTCGTTGGAGATATTCATGGCGTATTTTGGATGATAACGAGGCGCAAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	gênica [*]	R	AAAGGCAAAAAAAACCCCGCAGCAGCGGGGTTTTTCTACCAGACGAGAACCATATGAATATCCTCCTTAG
ompA	Confirmação	F	TCATGGCGTATTTTGGATGA [*]
	da mutação**	R	GACCGAAACGGTAGGAAACA ^{**}
fim ∆	Deleção	F	GAACGACTGCCCATGTCGATTTAGAAATAGTTTTTTTAAAGGAAAGCAGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	gênica*	R	GCTGCTTTCCTTTAAAAAAACTATTTCTAAATCGACATGGGCAGTCGTTCCATATGAATATCCTCCTTAG
лтА	Confirmação	F	GCGGCTCTGGCTGATACTAC
	da mutação ^{**}	R	CGTAATGACGTCCCTGAACC
vdeR	Deleção	F	GCCGATGTCACTATCACTGTTAATGGTCGGGTAGTCGGTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	gênica [*]	R	TTCAGAACCAGGTTGTTGCAGATTGCGCGTATAAAGATCCCATATGAATATCCTCCTTAG
	Confirmação	F	TTATTCACAGCAACTTT [*]
	da mutação ^{**}	R	TTCAGAACCAGGTTGTT ^{**}

Tabela 4 - Iniciadores desenhados para detecção, construção dos mutantes e confirmação das mutações.

*Seqüência de anelamento idêntica ao iniciador utilizado para confecção dos produtos da PCR para mutação (Ver seqüências sublinhadas).

** Seqüência de anelamento a uma região do DNA bacteriano, poucas bases antes do inserto, de modo que o produto da PCR com os iniciadores amplifiquem a região do inserto e comprovem que este inserto esteja no local correto.

4. Resultados

4.1. Adesão e invasão de Escherichia coli associada a sepse humana (SEPEC)

Segundo dados prévios, todas as 49 amostras SEPEC são capazes de aderir e invadir células Vero na presença e ausência de α -D-mannopiranosideo (Ananias e Yano, 2008). Análises por microscopia eletrônica de transmissão permitiram verificar SEPEC (*fim*H⁺) aderidas em superfície celular e no interior de células Vero em cultura na presença e ausência de α -D-manopiranosídeo (figura 4).



Figura 4 - Eletromicrografias de transmissão da adesão e invasão de SEPEC (*fim*H⁺) na presença de 1,0% de α -D-mannopiranosideo em células Vero. A= Bactérias aderidas em superfície celular e intracelular (seta). B= grupo de 4 bactérias, sugerindo replicação intracelular.

Os rins são considerados as principais vias de entrada de *E. coli* na corrente sanguínea, mas é a invasão e translocação da bactéria pelo endotélio que representam o "ponto chave" de como ocorre a propagação da bactéria pela circulação sistêmica. Estudos *in vitro* da adesão e invasão das 49 amostras SEPEC mostraram que 100% das amostras

também foram capazes de aderir e invadir células Huvec (Veia umbilical humana). Na figura 5, adesão de uma amostra SEPEC *fim*H⁺ na presença de α -D-manopiranosídeo.



Figura 5 - Adesão de SEPEC $fimH^+$ na presença de 1,0% de α -D-mannopiranosideo. Os ensaios de adesão foram realizados em células Vero: Rim de macaco verde africano e Huvec: Veia umbilical humana. A= Controle celular, Vero; B = Adesão bacteriana. C= Controle celular, Huvec. D= Adesão bacteriana em células Huvec. Aumentos: 400X.

4.2. Perfis protéicos em SDS-PAGE e extração diferencial de proteínas de membrana

No processo de extração diferencial de proteínas de membrana externa (*Outer membrane proteins*) foram gerados 3 extratos protéicos, dos quais 50µg de proteínas foram

submetidos a eletroforese SDS-PAGE. Na figura 6 são mostrados os 3 perfis protéicos dos extratos 1, 2 e 3 de SEPEC obtidos de 2 eventos independentes.



Figura 6 - Extração diferencial de proteínas de membrana externa de SEPEC. Géis SDS-PAGE realizados com 50µg de proteínas extraídas de cada passo: Extrato 1: Proteínas obtidas pela extração aquosa (passo 1); Extrato 2: Proteínas obtidas pela extração não aquosa, em 8M uréia, 4% p/v CHAPS e 100mM DTT (passo 2); e Extrato 3: 7M uréia, 2M tiouréia, 2% p/v CHAPS, 2% p/v SB 3-10 e 2mM TBP.

4.3. Identificação de potenciais adesinas de SEPEC por técnicas de proteômica

Proteínas de membrana externa (*Outer membrane proteins*, OMP's) estão na interface entre o patógeno e o hospedeiro, e representam os "pontos chave" na infecção bacteriana aos tecidos, ou células alvos (Molloy et al., 1998; Molloy et al., 2000). Nesse sentido, embora no DNA estejam contidos os genes de virulência bacteriana, são as proteínas as responsáveis pela "função biológica" ou fenótipo atribuído a virulência bacteriana. Por esse motivo, aplicamos técnicas de proteômica para a identificação de OMP's, dando ênfase nas que contribuem para a adesão e invasão de SEPEC.

Para identificar ligantes de SEPEC com afinidade para glicoproteínas de células Vero ou Huvec, as células em cultura foram incubadas com biotina, para marcação principalmente de glicoproteínas associadas a superfície celular (Cole e Ashman, 1987). Em seguida, extratos obtidos por esse método, denominados como bVero e bHuvec, foram utilizados como "sondas" para identificação de potenciais ligantes bacterianos a essas células, dentre os perfis protéicos obtidos em géis SDS-PAGE (vistos na figura 6). Os ensaios de *blot* iniciais revelaram uma banda protéica de massa molecular de aproximadamente 35KDa e outra próxima de 18KDa (figura 7). Como se observa na figura 4, a banda de 18KDa foi *blot*-positivo apenas no extrato 1, enquanto que a banda de 35KDa



Figura 7 - Identificação de potenciais adesinas de SEPEC. Na esquerda, os ensaios de *blotting* revelados com glicoproteínas de células Huvec marcadas com biotina (bHuvec). As setas mostram as bandas protéicas *blot*-positivas (esquerda) identificadas no respectivo gel SDS-Page (Direita). Géis SDS-Page (15,0%) foram corados com Comassie blue R-250. Para auxiliar na identificação das proteínas *blot*-positivas no respectivo gel, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Vermelho de Ponceau.

As bandas *blot*-positivas foram identificadas e cortadas do gel SDS-PAGE, submetidas a digestão e analisadas por espectrometria de massas (MS). As proteínas identificadas por MS correspondentes as bandas *blot*-positivas foram: (1) OmpA (Proteína de membrana A), cuja cobertura de seqüência foi de 29,8%, similar a OmpA de 37,292 KDa de *E. coli* O157:H7 str. EDL 933; (2) FimA (Subunidade maior da fimbria do tipo 1), uma proteína similar a FimA de 18,727 KDa de *E. coli* patogênica aviária, APEC O1 (Cobertura de seqüência de 74,0%), e YdeR (Subunidade fimbrial predita de *E. coli* K-12 str. MG 1655) (figura 8).



Figura 8 - Sequências aminoacídica resultantes da analise MS. A= proteína de membrana A [OmpA – *E. coli* O157:H7 str. EDL 933 (taxid:155864)]. B= subunidade maior da fimbria do tipo 1 [FimA – *E. coli* APEC O1 (taxid:405955)]. C= subunidade menor da fimbria do tipo 9 [YdeR – *E. coli* K-12 str. MG1655 (taxid:511145)]. Em vermelho e sublinhado as seqüências de coberturas dos peptídeos identificados (*matches*) para cada proteína.

Deste modo, foram estabelecidos para continuação dos estudos sobre a adesão e invasão de SEPEC: proteína de membrana A (OmpA), fimbria do tipo 1 (F1) e fimbria do tipo 9 (F9).

4.4. Estudo fenotípico da adesão de SEPEC

4.4.1. Inibição da adesão de SEPEC OmpA⁺ / F1⁺ com carboidratos e glicoproteínas

Tem sido demonstrado que a adesão e invasão de NMEC OmpA⁺ pode ser bloqueada por hidrolisado de quitina contendo polímeros GlcNAc (Chito-oligômeros) (Prassararao et al., 1996), e FimH⁺ (F1) é sensível a α -D-manopiranosideo (Abgottspon et al., 2010). A partir disso, foi verificado o efeito dos dois antagonistas quando utilizados em separado e quando utilizados juntos. Quando separados, α -D-manopiranosideo foi inibidor da adesão de SEPEC a células Vero, mas não teve o mesmo efeito em células Huvec (p \leq 0,05), enquanto que chito-oligômeros tiveram efeito inibidor nas duas linhagens celulares (p \leq 0,05). Por outro lado, os maiores valores inibitórios foram observados quando α -Dmanopiranosideo e Chito-oligômeros foram utilizados ao mesmo tempo, mostrando que GlcNAc e α -D-manopiranosideo quando atuando juntos agem como potentes inibidores da adesão, provavelmente ocupando os sítios de ligação a carboidratos das duas adesinas F1 e/ou OmpA, respectivamente (figuras 9 e 10).



Figura 9 - Inibição da adesão de SEPEC (F1⁺/ OmpA1⁺) em células Vero. Em I inibição com carboidratos: I= (M) α -D-manopiranosideo, (O) chito-oligossacarideos (polímeros β 1,4 GlcNAc). Em II, inibição com (V) glicoproteínas de células Vero ou (H) Huvec.



Figura 10 - Inibição da adesão de SEPEC (F1⁺/ OmpA1⁺) em células Huvec. Em I inibição com carboidratos: I= (M) α -D-manopiranosideo, (O) chito-oligossacarideos (polímeros β 1,4 GlcNAc). Em II, inibição com (V) glicoproteínas de células Vero ou (H) Huvec.

4.5. Estudo fenotípico da invasão de SEPEC

4.5.1. Invasão de SEPEC F1⁺/ OmpA⁺

O estudo fenotípico da invasão de SEPEC 53 foi realizado na presença e ausência de carboidratos como antagonistas de F1 e/ou OmpA, ou glicoproteínas das células hospedeiras utilizadas no estudo: Vero ou Huvec. Os resultados da invasão de SEPEC em células Vero e Huvec podem ser vistos nas figuras 11 e 12 respectivamente. Ações antagonistas dos carboidratos inibidores também foram significativos no processo de invasão de SEPEC ($p \le 0.05$), demonstrando que OmpA e F1 estão contribuindo na invasão de SEPEC.



Figura 11 - Inibição da invasão de SEPEC (F1⁺/ OmpA⁺) em células Vero. Em I inibição com carboidratos: I= (M) α -D-manopiranosideo, (O) chito-oligossacarideos (polímeros β 1,4 GlcNAc). Em II, inibição com (V) glicoproteínas de células Vero ou (H) Huvec.



Figura 12 - Inibição da invasão de SEPEC (F1⁺/ OmpA⁺) em células Huvec com carboidratos: I= (M) α -D-manopiranosideo, (O) chito-oligossacarideos, ou II= (V) glicoproteínas de células Vero ou (H) Huvec.

4.6. Estudo fenotípico da adesão e invasão de SEPEC selvagem e mutante para cada gene: *omp*A, *fim*A e *yde*R.

Para estudarmos como cada proteína identificada exerce seu papel na adesão e invasão de SEPEC, nós decidimos por deletar cada ORF (*Open Reading Frame*) correspondente as proteínas. Os resultados da adesão e invasão de SEPEC selvagem e mutante são mostrados na figura 13. Como se observa na figura abaixo, a adesão e invasão de SEPEC foi drasticamente afetada pela deleção de *omp*A ($p \le 0,001$). Redução dos valores da adesão e invasão também foram significativos nas deleções de *fim*A e *yde*R ($p \le 0,05$).



Figura 13 - Adesão e invasão de células Vero ou Huvec por SEPEC selvagens e mutantes nulos construídos para cada proteína identificada: OmpA, FimA ou YdeR. A= Adesão de SEPEC e B= Invasão de SEPEC, ambos em células Vero. C= Adesão de SEPEC e D= Invasão de SEPEC, ambos em células Huvec.

4.7. Papel de F9 na adesão e invasão de SEPEC

4.7.1. Adesão de SEPEC 53 F1⁺ / OmpA⁺/ F9⁺ (Selvagem) e SEPEC 53 F1⁺ / OmpA⁺/ F9⁻ (Mutante $\Delta y de$ R)

Embora F9 tenha sido descrita como estruturalmente similar a F1, ambas diferem quanto ao substrato de adesão. Segundo Low et al. (2006) e Ullet et al. (2007), F9 não se liga a substratos manosilados, como F1. Alem disso, nosso estudo sobre a ação de antagonistas na inibição da adesão e invasão de SEPEC sugere que deva haver outros fatores bacterianos contribuindo para a adesão e invasão de SEPEC. Assim, a fim de estudar fenotipicamente como F9 contribui para a adesão de SEPEC 53, foi construído um mutante F9, do qual foi deletado o gene *yde*R.

Resultados obtidos em estudos funcionais da adesão de SEPEC selvagem e F9mutante mostraram ações antagonistas de α -D-manopiranosideo (p \leq 0,05) (figuras 14 e 15). Logo, por ter sido demonstrado em trabalhos anteriores, como publicações de Low et al. (2006) e Ullet et al. (2007) que F9 é distinta de F1, quanto ao substrato de adesão, esses dados sugerem que F9 também esteja contribuindo para a adesão de SEPEC.



Figura 14 - Adesão de SEPEC 53 selvagem e SEPEC 53 mutante $\Delta y de$ R em células Vero. Em I e III ações antagonistas dos carboidratos (M) α -D-manopiranosideo, (O) chito-oligossacarideos (polímeros β 1,4 GlcNAc), em SEPEC selvagem e F9-mutante,



respectivamente. Em II e IV, inibição com (V) glicoproteínas de células Vero ou (H) Huvec.

Figura 15 - Adesão de SEPEC 53 selvagem e SEPEC 53 mutante $\Delta ydeR$ em células Vero. Em I e III ações antagonistas dos carboidratos (M) α -D-manopiranosideo, (O) chito-oligossacarideos (polímeros β 1,4 GlcNAc), em SEPEC selvagem e F9-mutante, respectivamente. Em II e IV, inibição com (V) glicoproteínas de células Vero ou (H) Huvec.

4.7.2. Invasão de SEPEC 53 F1⁺ / OmpA⁺/ F9⁺ (Selvagem) e SEPEC 53 F1⁺ / OmpA⁺/ F9⁻ (Mutante $\Delta y de R$)

O efeito da deleção do gene *yde*R também afetou na invasão de SEPEC em células Vero e Huvec, quando na presença do antagonista de F1 ($p \le 0,005$) (α -D-manopiranosideo) (figuras 16 e 17). Assim, se tomados juntos, nossos dados demonstram que assim como F1 e OmpA, F9 também representa um importante fator que contribui para a invasão de SEPEC.



Figura 16 - Invasão de SEPEC 53 selvagem e SEPEC 53 mutante $\Delta ydeR$ em células Vero. Em I e III ações antagonistas dos carboidratos (M) α -D-manopiranosideo, (O) chito-oligossacarideos (polímeros β 1,4 GlcNAc), em SEPEC selvagem e F9-mutante, respectivamente. Em II e IV, inibição com (V) glicoproteínas de células Vero ou (H) Huvec.



Figura 17 - Invasão de SEPEC 53 selvagem e SEPEC 53 mutante $\Delta ydeR$ em células Huvec. Em I e III ações antagonistas dos carboidratos (M) α -D-manopiranosideo, (O) chito-oligossacarideos (polímeros β 1,4 GlcNAc), em SEPEC selvagem e F9-mutante, respectivamente. Em II e IV, inibição com (V) glicoproteínas de células Vero ou (H) Huvec.

4.8. Caracterização genotípica de SEPEC e estudo das prevalências das adesinas estudadas

Analises moleculares realizadas com 49 amostras mostraram que, filogeneticamente (ECOR), SEPEC pertencem: 53,2% ao grupo D (26 amostras), 38,8% ao grupo B2 (19 amostras), 4,0% ao grupo B1 (2 amostras) e 4,0% ao grupo A (2 amostras). A genotipagem das amostras para os genes *omp*A, *fim*A e *yde*R mostraram que 100% das amostras foram *omp*A⁺, 98,0% foram *fim*A⁺ e 100% foram *yde*R⁺. Em relação as subunidades fimbriais estudadas, foram incluídos na caracterização genotípica iniciadores específicos para outras subunidades fimbriais, como: *f*1: foi realizada genotipagem para os genes: *fim*A e *fim*H; *f*9: foi realizada genotipagem para os genes: *fim*A e *fim*H; *f*9:

Desse modo, os resultados sobre as prevalências de $f1^+$ e $f9^+$ referem-se a amostras (*fim*AH⁺) ou (*fml*ABC⁺, *yde*RS⁺ *e fml*D⁺). Portanto, as prevalências foram: 100% (49 amostras) *omp*A⁺, 98,0% (48 amostras) *f*1⁺ e 63,3% (31 amostras) *f*9⁺. Em relação aos três fatores de adesão, a genotipagem mostrou que: 61,2% de SEPEC (30 amostras) são *omp*A⁺/*f*1⁺/*f*9⁺; 36,7% (18 amostras) são *omp*A⁺/*f*1⁺/*f*9⁻ e 2,1% (1 amostra) é *omp*A⁺/*f*1⁻/*f*9⁺.

4.8.1. Análises *in silico* das seqüências primárias das proteínas OmpA e FimH (adesina da fimbria do tipo 1)

O estudo *in silico* foi realizado com o objetivo de verificar a composição alélica em relação a *omp*A e *fim*H de SEPEC. Oito amostras SEPEC (*f*1⁺/ *omp*A⁺) foram escolhidas: SEPEC 17 e 53 (O2, grupo B2), SEPEC 36 e 37 (O2, grupo D), SEPEC 8 e 39 (O99 e O19, respectivamente, ambas do grupo B1), e SEPEC 26 e 42 (O17 e O1, respectivamente, ambas do grupo A). Nessas análises, também foram seqüenciados os genes *omp*A e *fim*H de amostras positivas para esses genes, e que foram utilizados como controle: Amostras *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC): NMEC O18:K1:H7 e UPEC O4:K6 str. J96; *E. coli* patogênica intestinal EHEC O157:H7 str. EDL933; e não patogênicas como: K12.C600, HB 101 e ORN115. Também foram incluídas seqüencias depositada em banco de dados, como NCBI.

Esses resultados mostraram que dentre as 8 amostras selecionadas, 4 amostras SEPEC possuem *omp*A1, assim como cepas patogênicas UPEC O4:K6 str. J96 e *E. coli* patogênica intestinal EHEC O157:H7, ou não patogênicas como K12.C600, HB 101 e ORN115; e 4 possuem o alelo *omp*A2, como NMEC O18:K1:H7. A distinção entre *omp*A1 e *omp*A2 foi realizada segundo descrito por Power et al. (2006) (figura 18).



Figura 18 - Seqüências de aminoácidos das proteínas OmpA deduzidas das seqüências de nucleotídeos dos genes *omp*A. Esses resultados representam os produtos da PCR obtidas para oito amostras SEPEC: 17 e 53, sorogrupos O2, filogrupo B2; 36 e 37, sorogrupos O2, filogrupo D; 8 e 39, sorogrupos O99 e O19, filogrupo B1, respectivamente; e sorogrupos O17 e O1, filogrupo A. Foram seqüenciados também *omp*A de *E. coli* HB 101 (não aderente), *E. coli* K12.C600, *E. coli* ORN 115 (padrão para F1⁺); UPEC O4:K6 str. J96 e *E. coli* O18:K1:H7 (associada a meningite neonatal, <u>invasiva</u>) e *E. coli* O157:H7 (EHEC, <u>não invasiva</u>).

A seqüência primária da proteína FimH também foi deduzida a partir das seqüências de DNA dos genes *fim*H. Esses dados apontaram para mutações pontuais em dois códons no gene *fim*H que resultam na substituição de dois aminoácidos na proteína FimH em 7 das 8 amostras SEPEC. As substituições aminoacídicas ocorreram nas posições 36 e 44 da proteína FimH, e são similares ao observado para FimH de NMEC. No aminoácido 36 ocorreu a troca de uma serina (S) por uma asparagina (N), mutação S-36-N, enquanto que na posição 44 ocorreu a troca de N por S, mutação N-44-S. Na amostra SEPEC 17 foi observada apenas a mutação S-36-N. Essas mutações não foram observadas para *E. coli* patogênicas como UPEC O4:K6 str. J96 ou não patogênicas como K12.C600 e ORN115 (figura 19).

APEC O1 Ac. YP_852080.1	міч	V M I	KKV	TL	FA	v	L L I	M G	W	s v	N A	W	SF	A	CK	I A	N	GТ	A I	P	IG	G	G S	AP	(V	Y V
AURE ON OPPORTUNITY PERSON 1																										
(UPEC) CF1073NP_753018.1								• •	-			-			-			• •	• •	-		-			-	· ·
K12.C600									-			-			-					-		-			-	
ORN 115									-			-			-					-		-				
UPEC_J96									-			-			-					-		-			-	
NMEC									-			-			-					-		-			-	
817 (00)																										
853 (01)							• • •		-			-			-			• •		-		-			-	· ·
355(02)								• •	-			-			-					-		-			-	· ·
\$36 (02)									-			-			_					-		-			-	
837 (02)									-			-			-					-		-			-	
S8 (099)									-			-			-					-		-			-	· ·
S39 (019)									-			-			-					-		-			-	· ·
\$26(017)																										
842 (01)								• •	-			-			-					-		-			-	· ·
						3	6	• •	-		44				-					-		-			-	•••
APEC O1 Ac. YP_852080.1	TLO	QRO	G S A '	YCG	V I	S	S F :	S G	T	V K	Y I	G	S S	Y I	PF	ΡT	T :	S E	T P	R	v v	Y	N S	R 1	D	K P
AUDE C) CET 022000 753019 1																										
(UFEC)CETU/SHE_/350181								• •	-			-			-			• •		-		-			-	· ·
K12.C600									-			-								-		-			-	
ORN 115									-			-			-					-		-			-	
UPEC_J96									-			-			-					-		-			-	
NMEC						- 1	<u> </u>		-		- 8	-			-					-		-			-	
817 (00)																										
S53 (02)							<u> </u>		•						-					-		-			-	· ·
							<u>.</u>	• •	-			-			-					-		-			-	· ·
S36 (O2)						- 1	<u>.</u> .		-		- 5				_					-		-				
\$37 (02)						- 1	. .		-		- 5				-					-		-			-	
S8 (099)						- 1	<u>N</u>		-		- 2	-			-					-		-			-	
839 (019)						- 1	<u>N</u>	• •	-		- 5	-			-			• •		-		-			-	· ·
S26 (O17)						1	N.				ç															
\$42 (01)							N													-						
											. 1			9	5											
APEC O1 Ac. YP_852080.1	Y N S	5 10 1	DEQI	EVV	V N I	¥.	A N I	ND	V	v v	PI	G	G C	ים:	V S	AB	D	V T	V I	L	PI	Y	PG	SI	7 P	IP
(UPE C) CET073NP 7530181															4											
[·····]·····]·····]·····									-			-								-		-			-	· ·
K12.C600									-			-			-					-		-			-	
ORN 115									-			-			-					-		-			-	
UPEC_J96									-			-		- 4	A .					-		-			-	· ·
INDERC								• •	-			-			-					-		-			-	· ·
\$17(02)																										
853 (02)								• •	-			-			-			• •		-		-			-	•••
`								• •	-			-			-					-		-			-	· ·
S36 (O2)									-			-			-					-		-			-	

Figura 19 - Seqüencias de aminoácidos das subunidades de FimH deduzidas das seqüencias de nucleotídeos dos genes *fim*H. Esses resultados representam os produtos da PCR obtidas para oito amostras SEPEC: 17 e 53, sorogrupos O2, filogrupo B2; 36 e 37, sorogrupos O2, filogrupo D; 8 e 39, sorogrupos O99 e O19, filogrupo B1, respectivamente; e sorogrupos O17 e O1, filogrupo A. Foram seqüenciados também *fim*H de *E. coli* K12.C600, *E. coli* ORN 115 (padrão para F1⁺); UPEC O4:K6 str. J96 e NMEC O18:K1:H7.

5. Discussão

A aderência e colonização de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) **são** as principais etapas nas infecções causadas por esse microrganismo em seres humanos (Russo e Johnson, 2000; Johnson *et al.*, 2001; Kaper *et al.*, 2004; Mokady *et al.*, 2005). Dados obtidos por nosso grupo revelaram que *E. coli* associada a sepse humana (SEPEC) formam um patotipo de *E. coli* heterogêneo quanto a fatores de virulência (Ananias e Yano, 2008) e são capazes de aderir e invadir células eucarióticas *in vitro* (Figura 4 e 5).

No Presente estudo, nós observamos por microscopia eletrônica de transmissão (MET) pontos de adesão bacteriana e bactérias intracelulares após 3h de incubação com células Vero na presença ou ausência de α -D-manopiranosideo (Figura 5), um antagonista específico da adesão mediada por FimH (adesina da fimbria do tipo 1) (Abgottspon et al., 2010), sugerindo que SEPEC está hábil a aderir e invadir células renais por mecanismos F1-independentes reforçando a hipótese de que os rins podem representar uma importante via de entrada de SEPEC para a corrente sanguínea (Kaper et al., 2004; Melican et al., 2011), e portanto, SEPEC deve possuir atributos ou fatores de virulência que as auxiliem na adesão e invasão de endoteliais durante o curso da infecção.

Estudos fenotípicos de adesão e invasão *in vitro* demonstraram que SEPEC também é capaz de aderir e invadir células endoteliais (Huvec), assim como foi observado para células Vero. Géis SDS-Page, ensaios de interações moleculares entre proteínas de membrana externa (OMP – Outer Membrane Proteins), *blotting* e espectrometria de massas (MS) permitiram identificar três OMP's com afinidades de ligações a glicoproteínas de células Vero e Huvec, sugerindo que essas proteínas representam potenciais adesinas bacterianas. As proteínas identificadas por MS correspondentes as bandas *blot*-positivas foram: OmpA (Proteína de membrana A), FimA (Subunidade maior da fimbria do tipo 1) e (3) YdeR (Subunidade menor da fimbria do tipo 9).

A proteína de membrana A (OmpA) é uma proteína homóloga a adesina/invasina Opa de *Neisseria meningitidis* (Dehio et al., 1998), e o principal fator de adesão e invasão de *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC) de células endoteliais cerebrais (Prasadarao et

al., 1996a; Kim, 2000; Datta et al., 2003; Power et al., 2006). FimA e YdeR são duas proteínas estruturais das fimbrias do tipo 1 (F1) e 9 (F9), respectivamente. F1 e F9 são fimbrias similares (Nuccio e Bämler, 2007 e Kline et al., 2009) porem funcionalmente distintas (Low et al., 2006 e Ullet et al., 2007). Em relação a F1, nossos dados são compatíveis com dados genotípicos anteriores e sugerem que F1 deve contribuir com outros fatores de virulência de SEPEC. Para F9 não há dados na literatura científica que mostram seus mecanismos ou substratos de adesão, mas segundo Low et al. (2006) F9 contribui para adesão de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC O157:H7) ao trato gastrointestinal e segundo Ullet et al. (2007) também agem na adesão de *E. coli* uropatogênica (UPEC) a células do trato urinário, assim como formação de biofilme em superfície inerte.

A adesão de *E. coli* via OmpA ocorre por interações moleculares com dímeros GlcNAc dispostos por glicoproteínas na superfície da célula hospedeira (Prasadarao et al., 1996a; Kim, 2000). Por outro lado, a afinidade entre F1 e receptores celulares ocorre por vias distintas quanto ao substrato de adesão, e ocorre por interações entre a adesina de F1, a proteína FimH a receptores manosilados (glicoproteínas contendo manose) (Abgottspon et al., 2010). Em relação a F9, embora seja estruturalmente similar a F1 (Prasadarao et al., 1996), F9 possui especificidades distintas quanto ao substrato de adesão (Low et al., 2006 e Ullet et al., 2007).

A ligação da bactéria a superfície celular geralmente ocorre pela ligação entre porções da proteína ligante (adesinas bacterianas) e carboidratos expostos pela célula hospedeira (receptores celulares) (Schembri et al., 2000; Abgottspon et al., 2010). Sob esse conceito, conhecendo-se a especificidade de ligação entre a adesina bacteriana e seu substrato de ligação, as interações entre a bactéria e a célula hospedeira podem ser bloqueadas na presença do substrato em suspensão por ocupação do sítio de ligação exposto pela adesina bacteriana. Assim, estudos funcionais da adesão e invasão bacteriana, utilizando-se extratos protéicos obtidos de células Vero ou Huvec mostraram que ambos possuem ação inibitória (figuras 9, 10, 11 e 12), demonstrando que nos extratos celulares estão presentes os receptores que permitem a ligação da bactéria, e, portanto a adesão e posterior invasão bacteriana. Alem disso, estudos funcionais, onde utilizamos α -D-manopiranosideo e/ou chito-oligossacarideos (polímeros β 1,4 GlcNAc) mostram que

ambos possuem ação inibitória tanto da adesão como da invasão, e que quando os dois estão presentes, maiores foram as diferenças observadas na adesão e invasão (figura 9, 10, 11 e 12). Esses dados, sugerem fortemente que OmpA e F1 representam duas adesinas de SEPEC que contribuem para sua adesão e invasão celular. Para testarmos essa hipótese, mutantes nulos foram construídos para cada proteína: $\Delta ompA$ ou $\Delta fimA$. Estudos funcionais da adesão e invasão mostraram similaridades entre a inibição observada para chito-oligossacarideos e $\Delta ompA$ (p $\leq 0,05$); e α -D-manopiranosideo e $\Delta fimA$ (p $\leq 0,05$). Juntos, esses dados demonstram que OmpA e F1 participam da adesão e invasão de SEPEC.

Em relação à OmpA nossos dados são similares aos observados por Kim (2000); Datta et al. (2003); Power et al. (2006) para a adesão e invasão NMEC, mas não consistentes com os resultados publicados por Prasadarao et al. (1996), pois segundo esses autores OmpA_{NMEC} está associada ao tropismo de NMEC ao endotélio cerebral e não sistêmico, como nossos resultados apontam. Por outro lado, resultados similares aos nossos também foram observados por Torres e Kaper (2003) para outro patotipo como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e outras linhagens celulares. Alem disso, independentemente de OmpA, nossos resultados também apontaram para F1 como importante fator de virulência de SEPEC. Esses resultados foram similares aos descritos por outros autores como Schembri et al., (2000) em estudos de adesão e invasão de *E. coli* uropatogênica (UPEC) ao trato urinário. Portanto, se juntos, nossos resultados sugerem que a adesão e invasão de SEPEC em células Vero e Huvec ocorrem por mecanismos sinérgicos entre os dois fatores de virulência.

Por outro lado, temos também identificado F9 como adesina de SEPEC, e para acessar como essa fimbria poderia estar associada a adesão e invasão de SEPEC, um mutante nulo para a proteína identificada (*yde*R) foi construído e ensaios de adesão foram realizados na presença e ausência dos carboidratos: α -D-manopiranosideo e/ou chitooligossacarideos. A adesão e invasão de SEPEC selvagem e mutante para F9 mostrou significativa redução da adesão e invasão na presença dos carboidratos (p \leq 0,05) mostrando que F9 também esta contribuindo para a adesão e invasão de SEPEC. Esses

resultados foram similares aos observados por Low et al., (2006) e Ullet et al. (2007), para EHEC e UPEC, respectivamente.

Em estudos *in silico* observamos que amostras SEPEC podem abrigar *omp*A1 ou *omp*A 2, segundo distinção proposta por Power et al. (2006). Juntamente a isso, a seqüência primária da proteína FimH também foi deduzida a partir das seqüências de DNA dos genes *fim*H, e esses dados apontaram para mutações pontuais em dois códons no gene *fim*H que resultam na substituição de dois aminoácidos na proteína FimH em 7 das 8 amostras SEPEC. As substituições aminoacídicas ocorreram nas posições 36 e 44 da proteína FimH, e são similares ao observado para FimH de NMEC. No aminoácido 36 ocorreu a troca de uma serina (S) por uma asparagina (N), mutação S-36-N, enquanto que na posição 44 ocorreu a troca de N por S, mutação N-44-S. Na amostra SEPEC 17 foi observada apenas a mutação S-36-N. Essas mutações não foram observadas para *E. coli* patogênicas como UPEC O4:K6 str. J96 ou não patogênicas como K12.C600 e ORN115 (figura 20).

Juntos, se considerarmos que *E. coli omp* $A2^+$ é associado a cepas mais invasivas do que *omp* $A1^+$ (Power et al., 2006), nós podemos sugerir que SEPEC *omp* $A2^+$ podem ser mais invasivas que SEPEC *omp* $A1^+$, porem *omp*A não deve estar associado ao tropismo de SEPEC por células renais e/ou endoteliais, visto que as seqüências de OmpA1 são similares entre SEPEC e outras linhagens de *E. coli*, e OmpA2 similar a NMEC. Por outro lado, mutações pontuais observadas na proteína FimH sugerem que essa proteína possa apresentar especificidades quanto a receptores específicos e patogenicidade de SEPEC. Logo, os alelos *omp* $A1^+$ ou *omp* $A2^+$ podem coexistir com variantes FimH e contribuir fenotipicamente para a patogenicidade de SEPEC.

Assim, nossos resultados mostram que a adesão e invasão de SEPEC, tanto em células Vero como Huvec não podem ser associados a um único fator de virulência, e sim, a combinações entre diferentes fatores bacterianos, e vias alternativas ou receptores distintos na célula hospedeira.

- Proteína de membrana A (OmpA), fimbria do tipo 1 (F1) e fimbria do tipo 9 (F9) contribuem para a adesão e invasão *in vitro* de *Escherichia coli* associada a sepse humana (SEPEC).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebersold, R. Constellations in a cellular universe. Nature. v.422, p.115-116, 2003.

- Ananias, M. and Yano, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. **Braz. J. Med. Biol.** Res.41: 877-883, 2008.
- Barbosa, H. R.; Rodrigues, M. F. A.; Campos, C. C.; Chaves, M. E.; Nunes, I.; Juliano, Y.; Novo, N. F. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. J. Micobiol. Met. 22: 39-50. 1995.
- Barnes H., Vaillancourt J., Gross W. Colibacillosis. Diseases of poultry. 11:631-652. 2003.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem** 72, 248-254. 1976.
- Clermont O.; Bonacorsi, S. Bingen, E. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. **Appl. Envir. Microb**. 66: p. 4555-4558, 2000.
- Cole, S. R.; Ashman, P. L. Biotinylation: An alternative to radioiodination for the identification of cell surface antigens in immunoprecipitates. Mol. Immunnol. 24: 699-705. 1987.
- Croxen, M. A. and Finlay, B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nat. Rev. Microbiol. 8: 1-38. 2009.
- Datta, D.; Vaidehi, N.; Floriano, W. B.; Kim, K. S.; Prasadarao, N. V.; Goddard, W. A. Interaction of *E. coli* outer-membrane protein A with sugars on the receptors of the brain microvascular endothelial cells. **Proteins**. 50: 213–221. 2003.
- Dehio, C.; Gray-Owen, S. D.; Meyer, T. F. The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. **Trends Microbiol**. 6, 489–495. 1998.

- Dho-Moulin M., Fairbrother J. M. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC). Veterinary research. 30:299-316. 1999.
- Girón, J A; Ho, A. S. Y., Schoolnik, G. K. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**. 175: 7391-7403. 1993.
- Johnson J.R.; Russo T.A.; Tarr P.I.; Carlino U.; Bilge, S.S.; Vary J.C.Jr; Stell, A.L. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, iha and iroNE. coli, among *Escherichia coli* Isolates from patients with urosepsis. **Infect Immun**. 68: 3040-3047, 2000.
- Johnson, J. R., O'Bryan, T. T., Kuskowski, M., and Maslow, J. N. Ongoing Horizontal and Vertical Transmission of Virulence Gene and papA Alleles among *Escherichia coli* Blood Isolates from Patients with Diverse-Source Bacteremia. Infect. Immun. 69: 5363-5374, 2001.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Rev. Microbiol. 2, 123-140, 2004.
- Kim, K. S. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells as a pathogenetic basis of meningitis. **Subcell Biochem**. 33: 47–59. 2000.
- Kline, K. A.; Fälker, S.; Dahlberg, S.; Normark, S.; Henriques-Normark, B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell. Host. Microbe.** 5: 580–592. 2009.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head fo bacteriofage T4. **Nature.** 1970;227:680-5.
- Low A. S.; Dziva, F.; Torres, A. G.; Martinez, J. L.; Rosser, T.; Naylor, S.; Spears, K.; Holden, N.; Mahajan, A.; Findlay, J.; Sales, J.; Smith, D. G; Low, J. C.; Stevens, M. P.; Gally, D. L. Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun. 74, 2233-2244. 2006.
- Mokady, D., Gophna, U., Ron, E. Z., Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. J. Clin. Microbiol. 295: 455-462, 2005.

- Molloy, M. P., Herbert, B. R., Slade, M. B. Rabilloud, T., Nouwens, A. S. Williams, K. L.;
 Gooley, A. A. Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane. J.
 Biochem. 267:1-12, 2000
- Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I., Traini, M., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., Willians, K. L., Gooley, A. A. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis. 19:837-844, 1998.
- Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P.,
 Rasschaert, D., Schouler, C. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Strains of Avian and
 Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. J.
 Clin. Microbiol. 10:3366-3376. 2007.
- Nuccio, S. P.; Baumler, A. J. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71: 551–575. 2007
- Pandey, A.; Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837-846, 2000.
- Pouttu, R.; Puustinen, T.; Virkola, R.; Hacker, J.; Klemm, P.; Korhonen, T. K. Amino acid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesins is critical for the adhesiveness of meningitis-associated *Escherichia coli* to collagens. **Mol. Microbiol.** 31: 1747-1757. 1999.
- Power, M. L.; Ferrari, B. C.; Littlefield-Wyer, J.; Gordon, D. M.; Slade, M. B.; Veal, D. A. A naturally occurring novel allele of *Escherichia coli* outer membrane protein A reduces sensitivity to bacteriophage. Appl Environ Microbiol 72: 7930–7932. 2006.
- Prasadarao, N. V.; Wass C. A.; Kim K. S. Endothelial cell GlcNAc beta 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. Infect Immun. 64: 154–160. 1996a.
- Prasadarao, N. V.; Wass, C. A.; Weiser, J. N.; Stins, M. F.; Huang, S. H.; Kim, K. S. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. **Infect. Immun.** 64: 146–153. 1996b.

- Renesto P, Samson L, Ogata H, Azza S, Fourquet P. Identification of two putative rickettsial adhesins by proteomic analysis. **Res Microbiol** 157: 605–612. 2006.
- Resch, A.; Leicht, S.; Saric, M.; Pásztor, L.; Jakob, A.; Götz, F. and Nordheim, A. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. **Proteomics-Jounal.** 6: 1867-1877. 2006.
- Russo T.A e Johnson J.R. "A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC." J. Infect. Dis. 181(5): 1753-1754. 2000.
- Salles, M. J. C., Sprovieri, S. R. S., Bedrikow, R., Pereira, A. C., Cardenuto, S. L., Azevedo, P. R. C., Silva T. M., Golin, V. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepse ³/₄ revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. Rev. Assoc. Med. Bras. 45. 86-92. 1999
- Schembri, M. A.; Sokurenko, E. V.; Klemm, P. Functional Flexibility of the FimH Adhesin: Insights from a Random Mutant Library. **Infect. Immunity**.68:2638-2646. 2000.
- Sokurenko, E. V.; Chesnokova, V.; Doyle, R. J.; Hasty, D. L.; Diversity os Escherichia coli type 1 fimbrial lectin. Differential binding to mannosides and uroepithelial cells. J. Biol. Chem. 272: 17880-17886. 1997.
- Torres, A. G.; Kaper, J. B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. **Infect. Immunit.** 71: 4985-4995. 2003
- Ullet, G. C.; Mabbett, A. N.; Fung, K. C.; Webb, R. I.; Schembri, M. A. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. Microbiology. 153: 2321-2331. 2007.

Anexo



Braz J Med Biol Res, May 2012, Volume 45(5) 417-424

doi: 10.1590/S0100-879X2012007500057

Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture

R.A. Conceição, M.S. Ludovico, C.G.T.J. Andrade and T. Yano



Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture

R.A. Conceição¹, M.S. Ludovico², C.G.T.J. Andrade³ and T. Yano¹

¹Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil
²Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil
³Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Abstract

The adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are essential for mediating direct interactions between the microbes and the host cell surfaces that they infect. Using fluorescence microscopy and gentamycin protection assays, we observed that 49 sepsis-associated *E. coli* (SEPEC) strains isolated from human adults adhered to and invaded Vero cells in the presence of D-mannose (100%). In addition, bacteria concentrations of approximately 2 x 10⁷ CFU/mL were recovered from Vero cells following an invasion assay. Furthermore, PCR analysis of adhesin genes showed that 98.0% of these SEPEC strains tested positive for *fim*H, 69.4% for *flu*, 53.1% for *csg*A, 38.8% for *mat*, and 32.7% for *iba*. Analysis of the invasin genes showed that 16.3% of the SEPEC strains were positive for *tia*, 12.3% for *gim*B, and 10.2% for *iba*A. Therefore, these data suggest that SEPEC adhesion to cell surfaces occurs through non-*fim*H mechanisms. Scanning electron microscopy showed the formation of microcolonies on the Vero cell surface. SEPEC invasiveness was also confirmed by the presence of intracellular bacteria, and ultrastructural analysis using electron transmission microscopy revealed bacteria inside the Vero cells. Taken together, these results demonstrate that these SEPEC strains had the ability to adhere to and invade Vero cells. Moreover, these data support the theory that renal cells may be the predominant pathway through which SEPEC enters human blood vessels.

Key words: Adhesion; Invasiveness; Escherichia coli; Sepsis

Introduction

Escherichia coli bacteria are commonly described as the major causative agent of extraintestinal infections, such as neonatal meningitis, bacteremia, pyelonephritis, cystitis, prostatitis, and sepsis (1-4). Paradoxically, this microorganism is also a predominant facultative member of the normal human intestinal microbiota (5,6). The adhesion of pathogenic bacteria to host cells represents the first step in establishing an infection. Subsequent events include the colonization of tissues and, in certain cases, cellular invasion followed by intracellular multiplication or persistence. The adhesion process is initiated when surface structures known as adhesins bind to their specific ligands, host cell receptors or extracellular matrix proteins (4,7).

Although the occurrence of *E. coli* bacteremia and sepsis has increased in recent years (3,8), there are few reports detailing the mechanisms of sepsis-associated *E*.

coli (SEPEC) pathogenesis. Furthermore, it is possible that the virulence genotypes and phylogenetic backgrounds of *E. coli* strains differ in diverse geographical regions (9). Recently, a study on the genetic profile of SEPEC strains reported heterogeneity in previously described extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) virulence factors (10).

The contamination by ExPEC strains is usually related to the contamination of urinary or other catheters (3,11). The urinary tract is the main gateway for ExPEC, particularly in cases of sepsis (4). Urinary infections often provoke bacteremia, especially in patients that are hospitalized because of catheter contamination by ExPEC biofilms (3). ExPEC strains, such as uropathogenic *E. coli* (UPEC), neonatal meningitis-associated *E. coli* (NMEC), and SEPEC, typically share many virulence factors that promote the colonization of host surfaces, avoidance and/or subversion of

Correspondence: T. Yano, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, UNICAMP, Caixa postal 6109, 13081-970 Campinas, SP, Brasil. Fax: +55-3521-6276. E-mail: tyano@unicamp.br

Received August 26, 2011. Accepted March 29, 2012. Available online April 13, 2012. Published May 7, 2012.

www.bjournal.com.br

host defense mechanisms, invasion and/or injury of cells and tissues and the initiation of inflammatory responses (4,9,12). In this study, we evaluated the presence of five adhesin-encoding genes (*fim*H, *flu*, *csg*A, *mat*, and *iha*) and three invasin-encoding genes (*ibe*A, *tia* and *gim*B) in 49 *E. coli* isolates from human sepsis patients and also investigated the adhesive and invasive abilities of these isolates in Vero cells.

Material and Methods

Bacterial strains

We analyzed a collection of 49 previously described SEPEC strains (10) maintained in our laboratories as stocks at room temperature. All strains were screened for the presence of adhesin/invasin-encoding genes and qualitatively assayed for their adhesion to and invasion of Vero cells. Based on these data, we selected four strains for further analysis using scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM).

Genotyping characterization

Molecular analysis assays. PCR amplifications were performed in a final reaction volume of 30 µL. The primers used for the analyses were selected from previously published sequences: i) adhesins: type I fimbriae (fimH) (13), antigen 43 (flu) (14), curly structural gene (csgA) (7), curly regulator gene (crl) (15), meningitis-associated and temperature regulated fimbriae (mat), iron-regulated-gene-homologue adhesion (iha); ii) invasins: pathogenicity island-associated and meningitis-associated (gimB) (9), brain microvascular endothelium cell invasion (ibeA) (9), and toxigenic invasion locus in enterotoxigenic E. coli strains (tia) (9), and iii) K1 capsular polysaccharide (neuC) (16). The PCR amplifications were performed using a GeneAmp PCR System 2400 thermocycler (Applied Biosystems, USA) under the following conditions: denaturation for 5 min at 94°C, 30 cycles of 60 s at 94°C, 30 s at the annealing temperature and 60 s at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C.

Adhesion and invasion assays

Qualitative adhesion assays. Monolayers of 10^5 Vero cells (African green monkey kidney cells) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA) were grown on coverslips (Falcon Becton Dickinson, USA) in 24-well plates in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-BRL, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS). The bacteria were grown in 3 mL trypticase soy broth for 18 h at 37°C. Vero cell monolayers were subsequently inoculated with approximately 3 x 10^8 bacteria/mL (tube 1 on the MacFarland scale) and incubated at 37° C for 3 h (17). All assays were performed in duplicate on different days, with or without D-mannose in the medium. We analyzed 49 SEPEC strains and used *E. coli* C600 as a negative control.

After 3 h of infection, each well was washed with PBS, and 0.1% Triton X-100 was added for 5 min. The coverslips were washed again, and 10 μ g/mLphalloidin was added to each coverslip for 30 min in the absence of light. Following this incubation, the coverslips were washed and treated with 100 μ g/mL RNase for 10 min. Propidium iodide was then added to the coverslips at 1.7 μ M for 5 min. The coverslips were then analyzed by microscopy.

Scanning electron microscopy

An ultrastructural analysis using SEM was performed on four SEPEC strains (SEPEC 8, 17, 19, and 53). After 3 h of infection, Vero cells were fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma, USA) and 2% glutaraldehyde (Electron Microscope Science, USA) in 10 mM cacodylate buffer, pH 7.4, mixed with equal volumes of cell culture medium. Subsequently, the slides were dehydrated with ethanol and immersed in propylene oxide/Epon 812 (Electron Microscope Science; ratios of 1:1 and 3:1) for 6 h. Ultrathin sections were obtained using an ultramicrotome and double-stained with 2% uranyl acetate (Fluka, Switzerland) and 0.5% lead citrate (Fluka). Finally, these sections were analyzed using a LEO-Schot Zeiss EM906 TEM at 80 kV.

Quantitative invasion assays. The bacterial invasion of Vero cells was measured using gentamycin protection assays and the enumeration of the colonies of viable intracellular bacteria (18). Prior to this assay, the minimal bactericidal concentration of gentamycin that reduced bacterial isolate counts by up to 99.9% was determined in DMEM, and gentamycin was first tested at 50 and 100 µg/ mL. Because similar results were obtained independent of gentamycin concentration, a final gentamycin concentration of 100 µg/mL was used in subsequent experiments. After 3 h of infection, the cell monolayers were washed with PBS, and 1.0 mL DMEM plus 2.0% FBS and 100 µg/mL gentamycin was added to each well to kill the extracellular bacteria. The plates were incubated for 2 h at 37°C before being washed ten times with 1 mL PBS per well. The intracellular bacteria were recovered by cell lysis with Triton X-100 (1.0%), and bacterial cell invasion was determined based on the number of colony-forming units (CFU/mL) on MacConkey agar plates (19). All assays were performed in duplicate on two different days, with or without D-mannose in the medium. Our results were compared to a positive control (enteroinvasive E. coli (EIEC) serotype O124:H-) (18) and a negative control (E. coli C600).

Transmission electron microscopy. TEM analyses were performed on four SEPEC strains (SEPEC 8, 17, 19, and 53). After 3 h of infection, Vero cell monolayers were fixed with 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde and 10 mM calcium chloride in 100 mM cacodylate buffer, pH 7.4, for 1 h at 25°C. Next, the cells were washed in cacodylate buffer and post-fixed with 1% osmium tetroxide (OsO₄) and 0.8% K₄Fe(CN)₆·3H₂O in 100 mM cacodylate buffer for 1 h. The samples were then washed in cacodylate buffer,

418
dehydrated in a graded series of alcohol, and embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were obtained, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined using a Jeol 1200 EX TEM.

Results and Discussion

Studies demonstrating the adhesion and invasiveness of human SEPEC strains are rare (10). In contrast to diarrheagenic E. coli, UPEC and NMEC, SEPEC strains do not exhibit a well-defined molecular virulence profile (10,12), and their pathogenicity mechanisms are not clear (4). SEPEC has emerged as a distinct E. coli group that appears to display a combination of the virulence characteristics of the other E. coli groups, including diarrheagenic E. coli and other ExPEC groups (4,10). In the present study, we analyzed the bacterial adhesion and invasion properties of SEPEC strains involved in 49 cases of human sepsis at the University Hospital of the State University of Campinas, Brazil. All of these studies were performed using Vero cells to represent the urinary tract because the kidneys could be an entry point of SEPEC into the bloodstream. The three-dimensional (3-D) architecture of the extracellular matrix of SEPEC isolates undergoing adhesion was also examined, and the invasion process was visualized using TEM. Vero cells are not derived from tumors and are an analogous model for studying SEPEC infections in renal cells, as previously published (10).

Currently, the mechanisms by which *E. coli* attaches to surfaces are not well defined. However, some cellular and extracellular structures, such as flagella, type I fimbriae, antigen 43, curli fimbriae and exopolysaccharides (EPS), are fundamental in establishing *E. coli* adhesion (20-22). Flagella are important for the initial interaction with and the movement of *E. coli* along surfaces (21), and type I fimbriae are required for the initial adhesion of *E. coli* to substrates (21). Both antigen 43, an outer membrane protein, and curli fimbriae play important roles in auto-aggregation, increased adhesion (23) and the persistence of bacteria on live tissues (24,25). Additionally, EPS produced by adhered bacteria builds extracellular matrices that are responsible for the formation of 3-D micro-colonies and *E. coli* persistence on different substrates (21).

In our study, the genotypic analysis of virulence factor genes showed a high prevalence of adhesin-encoding genes, with 48 isolates testing positive for *fim*H (98.0%), 34 for *flu* (69.4%), 26 for *csg*A (53.1%), 19 for *mat* (38.8%), and 16 for *iha* (32.7%). However, a low prevalence of invasin-encoding genes was observed, and only 8 isolates were positive for *tia* (16.3%), 6 for *gim*B (12.3%) and 5 for *ibe*A (10.2%) (Table 1). The *neu*C gene, which encodes K1 capsular polysaccharide, was amplified from only 24.5% of the strains. Because epidemiological studies have linked K1 to NMEC (26,27), these data suggest a genetic relationship between some SEPEC and NMEC isolates. 419

Data demonstrating the high prevalence of adhesin genes and the low prevalence of invasin genes in SEPEC strains are consistent with the literature (10), suggesting that SEPEC most likely adheres to cell surfaces by mechanisms different from those of other *E. coli* strains. Additionally, it is likely that SEPEC strains may express several other adhesion factors that are not yet known to be involved in their pathogenicity; these factors may also play a role in tissue specificity and the adhesion of SEPEC to epithelial and endothelial cells (data not shown).

For further adhesion and invasion assays, we analyzed four SEPEC strains using fluorescence microscopy, SEM and TEM. The strains chosen were SEPEC 8 (*fim*H⁺/*flu*⁺), SEPEC 17 (*fim*H⁺/*flu*⁺/*iha*⁺/*gim*B⁺), SEPEC 19 (*fim*H⁺/*flu*⁺/*gim*B⁺), and SEPEC 53 (*fim*H⁺/*flu*⁺/*csg*A⁺).

SEPEC adhesion was observed using a fluorescence assay, as shown in Figure 1.

SEM revealed the formation of microcolonies surrounded by an extracellular matrix when SEPEC strains adhered to Vero cells (Figures 2 and 3). Studies have shown that adhesion is crucial for the establishment of *E. coli*-associated extraintestinal infections (28), such as urinary tract infections (29). In particular, bacterial adhesion is important in establishing chronic cystitis and bloodstream infections associated with catheters (3). However, there are no consistent data on SEPEC adhesion to cell surfaces.

Overall, 98% of SEPEC strains were *fim*H-positive. Although type I fimbriae are important fimbriae used by UPEC to adhere to and invade bladder cells (13,29,30), the role of type I fimbriae in virulence is not as well defined as in other *E. coli* groups. However, because UPEC, SEPEC and other ExPEC groups share many virulence factors, *fim*H most likely has a similar function in SEPEC in the urinary environment. Thus, adhesion and invasion assays were performed in the presence of D-mannose. All SEPEC isolates (100%) adhered to and invaded cells in the presence of D-mannose (data not shown). Our invasion results were compared to those obtained for a positive control, and four SEPEC strains were subsequently chosen for ultrastructural analyses using SEM and TEM (Figure 4).

Using TEM, we observed that the bacteria adhered to many points on the cell surface, and we observed individual intracellular bacteria after 3 h of incubation with Vero cells in the presence or absence of D-mannose (Figure 5A). Additionally, bacterial subpopulations were observed, suggesting the presence of intracellular bacterial replication (Figure 5B).

Thus, SEPEC strains adhered to Vero cells, formed microcolonies, produced an extracellular matrix, invaded cells, and probably replicated inside Vero cells. These findings suggest the occurrence of two simultaneous yet independent events. In fact, the adhesion to and invasion of Vero cells by SEPEC strains can be important factors involved in their pathogenicity, and these results may suggest one of the possible steps of SEPEC entry into kidney blood vessels.

No. SEPEC strain	K1 capsular polysaccharide neuC	Adhesins						Invasins		
		fimH	flu	csgA	crl	mat	iha	gimB	ibeA	tia
3	2	+	12	-	+	20	-	20	-	+
4		+	+	-	+	-	+	-	-	-
5	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
8	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
10	2	+	-	+	+	+	-	+	+	-
13	2	+	+	-	+	-	+	-	-	-
14	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
16	2	+	+	-	+	+	+	-	+	-
17	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
18		+	+	+	+	-	+	+	-	-
19	2	+	-	-	+	-	-	+	-	-
20	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
21	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
22	2	+	+	-	+	-	+	-	-	-
23	2	+	-	+	+	+	-	-	+	-
24	2	+	1	+	+	+	-	+	-	-
25	2	-	+	-	+	+	+	-	+	-
26	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
27	+	+	+	-	+		-	-	-	-
28	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
29	+	+	-	-	+	-	(-)	-	-	-
31	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
33	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
34	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
36	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
37	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
38	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
39	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
40	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
41	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
42	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
43	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
44	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
47	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
48	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
49	+	+	+	+	+		-		-	+
50	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
51	+	+	+	-	+		-		-	+
52	5	+	-	+	+	+	-		-	-
53	-	+	+	+	+	\sim	-	20	-	-
54	+	+	+	+	+		+	20	-	+
56	5	+	+	+	+	+	+	20	-	-
57	-	+	-	-	+	\sim	+	20	-	-
58	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
62	-	+	+	+	+	+	+	20	-	-
71	-	+	-	-	+	-	-	20	-	-
74	-	+	-	×	+	-	-	-	-	-
76	-	+	+	-	+		-	-	-	-

Table 1. Genotypic analysis of human sepsis-associated Escherichia coli (SEPEC) strains.

Braz J Med Biol Res 45(5) 2012

www.bjournal.com.br



Figure 1. The adhesion of human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) strains to Vero cells was observed using a fluorescence assay. *A*, Negative control. *B*, SEPEC 8 (*fim*H⁺, *flu*⁺, *csg*A⁻, *mat*⁻, *iha*⁻, *gim*B⁻, *ibe*A⁻, *tia*⁻, *neu*C⁻) adhering to the cell surfaces.



Figure 2. Scanning electron micrograph of human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) 8 (*fim*H⁺, *flu⁺*, *csg*A⁻, *mat*, *iha⁻*, *gim*B⁻, *ibe*A⁻, *tia⁻*, *neu*C⁻) adhesion after 3 h of incubation with Vero cells. A, The bacteria adhered to the cell surface. B, Details of the points of microcolony formation. C, Microcolony details. D, Details of the network of extracellular matrix surrounding the microcolonies on the cell surface.

www.bjournal.com.br

Braz J Med Biol Res 45(5) 2012

421

76



Figure 3. Scanning electron micrograph of human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) 8 (*fim*H⁺, *flu*⁺, *csg*A⁻, *mat*⁻, *iha*⁻, *gim*B⁻, *ibe*A⁻, *tia*⁻, *neu*C⁻) adhesion after 3 h of incubation with Vero cells. A, Bacterial adhesion to the cell surface, with the formation of microcolonies surrounded by extracellular matrix (arrow). B, Early extracellular matrix production by bacteria adhered to the cell surface (arrow).



Figure 4. Colony-forming units (CFU/mL) of the human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) strains chosen for transmission electron microscopy and scanning electron microscopy that were recovered from the intracellular environment. All 49 strains were recovered at higher concentrations (up to 2×10^7 CFU/mL) than the positive control (EIEC 0124:H) in the presence or absence of D-mannose in the medium. The negative control, *E. coli* C600, did not invade Vero cells.



Figure 5. Transmission electron micrographs of SEPEC 8 (fimH⁺, flu⁺, csgA⁻, mat⁻, iha⁻, gimB⁻, ibeA⁻, tia⁻, neuC⁻) adhesion and invasion after 3 h of incubation with Vero cells in the presence or absence of D-mannose. A, Bacteria that adhered to the cell surface (arrow) and intracellular bacteria in the absence of D-mannose. B, A group of four bacteria that suggests intracellular bacterial replication in the absence of D-mannose.

Extraintestinal infections caused by *E. coli*, such as urinary infections, are common causes of bacteremia (3,30), a condition that always precedes sepsis. Therefore, SEPEC adhesion to host tissues, such as the kidney, could be an important factor in the course of sepsis by providing an entrance to the bloodstream. Once in the bloodstream, SEPEC strains must have favorable genetic compositions to survive in the blood and, in this way, induce sepsis (10). Some investigators have described the importance of *fim*H (31-33), *ag*43 (34,35) and *csg*A (25) in urinary tract and meninges infections. In addition, *csg*A has been shown to contribute to coagulation and blood pressure abnormalities, thereby contributing to SEPEC-induced septic shock (7).

The mechanisms by which SEPEC adhere to and invade Vero cells are not clear. However, these mechanisms suggest a gateway for SEPEC entry into the bloodstream during the course of sepsis. Although the adhesion to and invasion of eukaryotic cells by other ExPEC groups have

References

- Eisenstein BI, Jones GW. The spectrum of infections and pathogenic mechanisms of *Escherichia coli*. Adv Intern Med 1988; 33: 231-252.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol 2004; 2: 123-140.
- Martinez JA, Soto S, Fabrega A, Almela M, Mensa J, Soriano A, et al. Relationship of phylogenetic background, biofilm production, and time to detection of growth in blood culture vials with clinical variables and prognosis associated with *Escherichia coli* bacteremia. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1468-1474.
- 4. Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Virulence factors of septice-

been previously described (28,32), our data detail these processes for SEPEC clinical isolates and suggest a possible mechanism for SEPEC entry into blood vessels. We will continue searching for the factors involved in SEPEC adhesion and the relationship of these factors to the development of human sepsis. Currently, we are conducting proteomic analyses of the adhesion and invasion factors that are related to SEPEC adhesion to Vero cells to further elucidate the mechanisms involved in human sepsis.

Acknowledgments

We thank Dr. Luciano Moura Martins (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil) and Robert Alvin Bernedo Navarro (Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil) for scientific support and Ana Stella Menegon Degrossoli (Universidade Estadual de Campinas) for technical assistance. Research supported by CAPES.

mic Escherichia coli strains. Int J Med Microbiol 2005; 295: 455-462.

- Selander RK, Caugant DA, Whittam TS. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: Neidhardt FC, Ingraham KL, Magasanik B, Low KB, Schaechter M, Umbarger HE (Editors), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington: an Society for Microbiology; 1987. p 1625-1648.
- Selander RK, Korhonen TK, Vaisanen-Rhen V, Williams PH, Pattison PE, Caugant DA. Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal sep-

77

423

ticemia and meningitis. Infect Immun 1986; 52: 213-222.

- Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis* 2000; 181: 602-612.
- McBean M, Rajamani S. Increasing rates of hospitalization due to septicemia in the US elderly population, 1986-1997. *J Infect Dis* 2001; 183: 596-603.
- Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antao EM, et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitiscausing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* 2007; 297: 163-176.
- Ananias M, Yano T. Serogroups and virulence genotypes of Escherichia coli isolated from patients with sepsis. Braz J Med Biol Res 2008; 41: 877-883.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 95-108.
- Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 26-38.
- Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC Jr, et al. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, iha and iroN (*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect Immun* 2000; 68: 3040-3047.
- Yang HH, Vinopal RT, Grasso D, Smets BF. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1528-1536.
- Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli. Avian Dis* 1998; 42: 106-118.
- Watt S, Lanotte P, Mereghetti L, Moulin-Schouleur M, Picard B, Quentin R. *Escherichia coli* strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1929-1935.
- Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 1984; 45: 534-536.
- Peerbooms PG, Verweij AM, Maclaren DM. Vero cell invasiveness of *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* 1984; 43: 1068-1071.
- Barbosa HR, Rodrigues MFA, Campos CC, Chaves ME, Nunes I, Juliano Y, et al. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. *Methods* 1995; 22: 39-50.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
- Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 2000; 37: 424-432.

- Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol 1998; 30: 285-293.
- Hasman H, Chakraborty T, Klemm P. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J Bacteriol* 1999; 181: 4834-4841.
- Gophna U, Barlev M, Seijffers R, Oelschlager TA, Hacker J, Ron EZ. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect Immun* 2001; 69: 2659-2665.
- Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 875-884.
- Achtman M, Heuzenroeder M, Kusecek B, Ochman H, Caugant D, Selander RK, et al. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect Immun* 1986; 51: 268-276.
- Kim KS, Itabashi H, Gemski P, Sadoff J, Warren RL, Cross AS. The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *J Clin Invest* 1992; 90: 897-905.
- Ramírez RM, Almanza Y. Adherence and invasion of avian pathogenic *Escherichia colito* avian tracheal epithelial cells. *W J Microbiol Biotech* 2009; 25: 1019-1023.
- Tiba MR, Yano T, Leite DS. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2008; 50: 255-260.
- Rijavec M, Muller-Premru M, Zakotnik B, Zgur-Bertok D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1329-1334.
- Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Marild S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9827-9832.
- Kau AL, Hunstad DA, Hultgren SJ. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 54-59.
- Pouttu R, Puustinen T, Virkola R, Hacker J, Klemm P, Korhonen TK. Amino acid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesin is critical for the adhesiveness of meningitis-associated *Escherichia coli* to collagens. *Mol Microbiol* 1999; 31: 1747-1757.
- Kjaergaard K, Schembri MA, Hasman H, Klemm P. Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens. J Bacteriol* 2000; 182: 4789-4796.
- Ulett GC, Mabbett AN, Fung KC, Webb RI, Schembri MA. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. *Microbiology* 2007; 153: 2321-2331.