

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2021.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Caracterização fenotípica e molecular de isolados de
Escherichia coli uropatogênica provenientes de pacientes no
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu**

Rodrigo Hideki Souza Tanabe

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Camargo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de
Parasitas e Microrganismos*.

Rodrigo Tavanelli Hernandes

BOTUCATU – SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tanabe, Rodrigo Hideki Souza.

Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Escherichia coli* uropatogênica obtidos de pacientes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu / Rodrigo Hideki Souza Tanabe. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandes

Coorientador: Carlos Henrique Camargo

Capes: 21201021

1. Trato urinário - Infecções. 2. *Escherichia coli*.
3. beta-Lactamases. 4. Resistência microbiana a medicamentos.

Palavras-chave: Beta-lactamase de espectro estendido;
Escherichia coli uropatogênica; Infecção do trato urinário;
Resistência a antimicrobianos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes, por me orientar em todos os momentos desta dissertação de mestrado. Pelo seu conhecimento e pela convivência no desenvolvimento do mestrado, na presença no laboratório, todos os dias. Muito Obrigado.

À todos os meus familiares e amigos, que me apoiaram, motivaram e incentivaram.

Ao Prof^o Dr. Carlos Henrique Camargo por aceitar ser meu coorientador e por todo auxílio fornecido durante o desenvolvimento do projeto.

Aos meus companheiros/amigos de laboratório Melissa Arruda Vieira, Regiane Chrysostomo Bitencort Dias, Henrique Orsi pelo companheirismo, risadas, alegrias. A todos vocês muito obrigado pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa. Muito Obrigado.

À Cefar, pela doação dos discos de antibióticos utilizados nessa pesquisa.

À CAPES, pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados dos pacientes com diagnóstico clínico de infecção do trato urinário.	10
Tabela 2. Sequencias empregadas para a pesquisa de marcadores de virulência associados a patogenicidade de isolados de ExPEC.	12
Tabela 3. Sequencias de iniciadores empregados para a pesquisa de marcadores dos patotipos EPEC e EAEC.	13
Tabela 4. Sequências empregadas para a pesquisa de marcadores de virulência associados à patogenicidade de isolados de EAEC.....	14
Tabela 5. Sequências empregadas para a detecção dos principais determinantes genéticos associados à produção de ESBL.	16
Tabela 6. Associação entre faixa etária dos pacientes e os isolados de UPEC classificados nos distintos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	18
Tabela 7. Distribuição de genes codificadores de fatores de virulência em isolados de UPEC identificados nos distintos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	19
Tabela 8. Isolados de UPEC com marcadores de DEC.....	20
Tabela 9. Características dos isolados de UPEC com marcadores de EAEC e EPEC	22
Tabela 10. Marcadores de virulência associados à patogenicidade de EAEC pesquisados nos isolados UPEC com os genótipos <i>aatA</i> +/ <i>aggR</i> + e <i>aatA</i> -/ <i>aggR</i> -.....	23
Tabela 11. Frequência de resistência dos isolados de UEPC frente à 19 drogas antimicrobianas testadas.	24
Tabela 12. Características dos isolados produtores de betalactamases de espectro estendido.	25
Tabela 13. Relação dos antimicrobianos de isolados multirresistentes.....	26

Lista de abreviações

- DEC.....*Escherichia coli* diarreiogênica
- EPEC.....*Escherichia coli* enteropatogênica
- EAEC.....*Escherichia coli* enteroagregativa
- UPEC.....*Escherichia coli* uropatogênica
- ExPEC....*Escherichia coli* extra-intestinal
- ITU.....Infecção do trato urinário
- PCR.....Reação em cadeia de polimerase
- CBI.....Comunidade bacteriana intracelular
- EIEC.....*Escherichia coli* enteroinvasora
- EHEC.....*Escherichia coli* enterohemorrágica
- ETEC.....*Escherichia coli* enterotoxigênica
- DAEC....*Escherichia coli* de aderência difusa
- CNF1....Fator necrosante citotóxico 1
- AA.....Adesão agregativa
- ESBL....Beta-lactamase de espectro estendido
- EPM.....Escola Paulista de Medicina
- UFC.....Unidade formadora de colônia

Sumário

1. Resumo	1
2. Abstract	2
3. Introdução	3
4. Objetivos	9
5. Material e Métodos	10
<i>5.1 Isolamento e identificação de Escherichia coli</i>	10
<i>5.2 Detecção de fatores de virulência associados à patogenicidade de ExPEC</i>	10
<i>5.3 Detecção de marcadores diagnósticos para os patotipos EPEC e EAEC</i>	13
<i>5.4 Detecção de fatores de virulência associados à patogenicidade de EAEC</i>	13
<i>5.5 Classificação filogenética</i>	14
<i>5.6 Cultura de células HeLa e determinação do padrão de aderência</i>	14
<i>5.7 Teste de identificação da polimerização de actina</i>	15
<i>5.8 Teste de susceptibilidade antimicrobiana</i>	15
<i>5.9 Produção de Beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL) e detecção dos principais determinantes genéticos associados a esse fenótipo</i>	16
6. Resultados	17
7. Discussão	28
8. Conclusão	33
9. Referências	34

1. Resumo

Escherichia coli uropatogênica (UPEC) causa a maioria das infecções do trato urinário (ITU), incluindo cistite e pielonefrite, no hospedeiro humano. A UPEC utiliza numerosos fatores de virulência para entrar, aderir, colonizar, adquirir nutrientes essenciais, multiplicar e causar danos ao ambiente do trato urinário. Estudos recentes demonstraram que alguns isolados de UPEC carregam fatores de virulência associados à patótipos diarréio-gênicos de *E. coli* (DEC), como EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e EPEC (*E. coli* enteropatogênica). Uma grande preocupação nas infecções por UPEC é o aumento da resistência antimicrobiana, levando à falha do tratamento em algumas ITUs causadas por esse patógeno. Nesse estudo, um total de 118 isolados de UPEC de amostras ambulatoriais de urina de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina de Botucatu entre março e maio de 2018. Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para detectar 29 genes que codificam fatores de virulência, bem como marcadores de DEC (*escN*, *stx1/2*, *aatA* e *aggR*); além de genes que codificam adesinas e toxinas associadas ao patótipo EAEC. Os isolados de UPEC foram designados nos diferentes filogrupos de *E. coli*, utilizando um PCR quadruplex; e a determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi realizada pelo método de disco difusão. Entre os isolados estudados, 39,8% foram atribuídos ao filogrupo B2, enquanto UPEC dos filogrupos B1 (14,4%), A (14,4%), D (12,7%), F (8,5%), G (3,4%), E (2,5%), *E. clades* (2,5%) e C (1,7%) também foram observados. Entre os genes codificadores de virulência pesquisados, *fimH* (98,3%), *ecpA* (78,0%), *traT* (82,2%) e *ompT* (62,4%) foram os mais frequentes. Os genes utilizados para a identificação de EAEC (*aatA* e *aggR*) e EPEC (*escN*) foram identificados em cinco (4,2%) e um (0,8%) dos isolados de UPEC, respectivamente. As maiores taxas de resistência foram observadas para os seguintes antimicrobianos: ampicilina (45,8%), cotrimoxazol (34,7%) e ácido nalidíxico (32,2%). Foram identificados 11,8% isolados de UPEC estudados confirmados como produtores de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Genes responsáveis por codificar ESBL foram detectados em 78,6% dos isolados de UPEC-ESBL+, sendo esses: *bla_{CTX-M-15}* (42,9%), *bla_{CTX-M-8}* (21,4%), e *bla_{CMY2}* (14,3%). Entre os isolados estudados, 16,1% apresentaram o fenótipo de multirresistência. Entre os isolados de UPEC classificados como multirresistentes 73,7% apresentaram resistência aos antimicrobianos pertencentes às classes dos betalactâmicos, das quinolonas e dos inibidores da via folato. Também foi observado que entre os isolados de UPEC multirresistentes, 52,6% foram capazes de produzir ESBL. Em conclusão, observamos que os isolados UPEC atribuídos ao filogrupo B2 abrigavam um maior número de genes codificadores de virulência que podem auxiliar na colonização e sobrevivência no trato geniturinário. Além disso, o número de isolados de UPEC não susceptíveis aos antimicrobianos testados, pode servir como um alerta para os profissionais da área da saúde, a fim de selecionar de maneira mais adequada o tratamento a ser usado nas ITUs.

Palavras chave: Resistência a antimicrobianos, betalactamase de espectro estendido, infecção do trato urinário, *Escherichia coli* uropatogênica.

2. Abstract

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) cause the majority of urinary tract infections (UTIs), including cystitis and pyelonephritis, in the human host. UPEC utilizes numerous virulence factors to entry, adhere, colonize, acquire essential nutrients, multiply and cause damage in the urinary tract environment. Recent studies have shown that some UPEC isolates carry virulence factors associated with the diarrheagenic *E. coli* (DEC) pathotypes, such as EAEC (enteroaggregative *E. coli*) and EPEC (enteropathogenic *E. coli*). A major concern in UPEC infections is the constant increasing of antimicrobial resistance, thus leading to treatment failure in some UTIs caused by this pathogen. In this study a total of 118 UPEC isolates were obtained from outpatient urine samples, attended at University Hospital of Botucatu Medical School between March and May of 2018. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect 29 virulence factor-encoding genes, diarrhoeagenic *E. coli* markers, (*escN*, *stx1/2*, *aatA* and *aggR*), as well as genes encoding adhesins and toxins associated with the EAEC pathotype. The UPEC isolates were assigned in the distinct *E. coli* phylogroups, using a quadruplex PCR; and the determination of the antimicrobial resistance profile was performed using the disk-diffusion method. Among the isolates studied, 39.8% were assigned to phylogroup B2, while UPEC isolates from other phylogroups were detected as follows: B1 (14,4%), A (14,4%), D (12,7%), F (8,5%), G (3,4%), E (2,5%), *E. clades* (2,5%) and C (1,7%). Among the virulence-encoding genes searched, *fimH* (98,3%), *ecpA* (78,0%), *traT* (82,2%) and *ompT* (62,4%) were the most frequent detected. Genes used for the identification of EAEC (*aatA* and *aggR*) and EPEC (*escN*) were identified in five (4.2%) and one (0.8%) of the UPEC isolates, respectively. The highest resistance rates were observed for the following antimicrobials drugs: ampicillin (45,8%), trimethoprim-sulfamethoxazole (34.7%) and nalidixic acid (32.2%). Among the isolates studied, 11.8% were confirmed as Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers. The genes responsible for encoding ESBL were detected in 78.6% of the UPEC-ESBL +as follow: *bla_{CTX-M-15}* (42.9%), *bla_{CTX-M-8}* (21.4%) and *bla_{CMY2}* (14 3%). Among those studied, 16.1% had the multidrug resistance phenotype. Most UPEC isolates with multidrug resistant (73.7%) are resistant to antimicrobials belonging to the classes of betalactams, quinolones and folate inhibitors. We could also observe that among the multidrug resistant UPEC isolates, 52.6% were able to produce ESBL. In conclusion, we observed that UPEC isolates assigned to the phylogroup B2 harbored a higher number of virulence-encoding genes that can assist in the colonization and survival in the genitourinary tract. Also, the increase of the number of UPEC isolates nonsusceptibility to some of the antimicrobial drugs tested, may serve as an alert for the physicians in order to better select the treatment to be used in the UTIs.

Keywords: Antimicrobial resistance, extended spectrum betalactamase, urinary tract infection, uropathogenic *Escherichia coli*.

3. Introdução

E. coli uropatogênica (UPEC) é um dos principais agentes causadores de doenças como cistites, pielonefrites, bacteriúria assintomática e prostatite [Foxman, 2010]. Alguns dos fatores de risco são: a faixa etária, a uretra curta, a proximidade ao ânus (característica do sexo feminino), a gravidez, implante de sondas vesicais, alteração urológica de origem anatômica ou funcional, entre outros [Terlizzi *et al.*, 2017; Foxman 2014]. A ocorrência de refluxo da urina contaminada para os ureteres pode levar à pielonefrite que, diferentemente das cistites não complicadas, pode induzir morbidade e mortalidade [Terlizzi *et al.*, 2017; Nuutinen *et al.*, 2001; Tolg *et al.*, 2002].

Atualmente, projeta-se a ocorrência anual de, pelo menos, 200 milhões de casos de infecções do trato urinário humano em todo o mundo, sendo 80% dessas infecções causadas por UPEC, e a grande maioria, ocorrendo em indivíduos do sexo feminino [Stamm, 2002]. *E. coli* é o agente etiológico de 90 % das infecções de origem comunitária e de cerca de 50 % das infecções hospitalares que acometem o trato urinário [Foxman, 2014]. As infecções do trato urinário (ITUs) também são frequentes entre os neonatos do sexo masculino, aonde a não circuncisão é um fator de risco [Stamm *et al.*, 1993]. Entre as crianças maiores, as meninas são as mais frequentemente acometidas [Stamm *et al.*, 1989]. As ITUs são as infecções mais frequentes também em mulheres grávidas [Stamm, 2002]. Os fetos de mulheres que apresentam pielonefrite nos primeiros meses de gestação têm grande risco de morte ou de graves sequelas pós-nascimento [Flores-Mireles *et al.*, 2015]. Nos idosos sadios a bacteriúria assintomática ocorre em até 25% dos indivíduos e, cerca de, 10% destes terá evolução sintomática [Stamm, 2002]. Outros fatores de risco para a ocorrência de ITUs são: danos na medula, diabetes, esclerose múltipla, cateteres urinários, HIV/AIDS, hipertrofia de próstata e anormalidades urológicas [Foxman, 2014; Tabasi *et al.*, 2016].

ITUs são causadas tanto por bactérias Gram-negativas como por bactérias Gram-positivas, e por alguns fungos. Entre os agentes envolvidos em ITUs não complicada, podemos destacar: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* do grupo B, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp.* [Foxman, 2014; Kline *et al.*, 2011]. Para ITUs complicadas, os agentes causadores mais comuns são: *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *Candida spp.*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus* do grupo B [Levison *et al.*, 2013; Jacobsen *et al.*, 2008]. A *E. coli* é o agente causador mais comum para ambos os tipos de ITUs [Nielubowicz *et al.*, 2010].

E. coli é um microorganismo presente na microbiota do intestino humano; no entanto, às vezes são responsáveis por causar infecções intestinais e extra-intestinais, sendo a *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) um dos principais agentes etiológicos de bacteremia causada por bacilos Gram-negativos [Koga *et al.*, 2014]. ExPEC responsáveis por ITUs são denominadas *E. coli* uropatogênica, sendo diferenciados dos isolados comensais e diarreio gênicos em relação aos grupos filogenéticos a que pertence, bem como, com relação aos fatores de virulência que albergam [Kaper *et al.*, 2004]. Os isolados comensais e diarreio gênicos pertencem principalmente aos grupos filogenéticos A e B1 [Moreno *et al.*, 2005, Santos *et al.*, 20013], enquanto a maioria dos isolados de ExPEC se enquadram no grupo B2 e, mais raramente, nos grupos D e F [Paiva *et al.*, 2013].

ExPEC apresenta uma grande variedade de genes que codificam fatores de virulência, os quais tem a propriedade de codificar proteínas, que podem contribuir para a patogenicidade desses isolados, tais como: adesinas (*fimH*, *papA*, *papC*, *afaBC*, *sfaDE*, *ecpA*, *iha*, *bmaE*, *hra*), invasinas (*ibe10*), sistemas de captação de ferro (*iron*, *irp2*, *iucD*, *ireA*, *sitA*), protactinas (*traT*, *ompT*, *iss*, *kpsMTII*, *cva*) e toxinas (*hlyA*, *cnf1*, *cdt*, *sat*, *vat*, *usp*, *hlyF*, *tsh*) [Tabasi *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 20013; Cyoia *et al.*, 2015]. Essas propriedades encontram-se codificadas em determinantes genéticos variados, e um único isolado pode apresentar diversos determinantes codificando para a mesma propriedade [Bélanger *et al.*, 2011]. Dessa forma, as ExPEC podem possuir múltiplas adesinas, sideróforos, sistemas de escape das defesas do hospedeiro, que são expressas de forma coordenada para que a bactéria possa avançar no interior do hospedeiro até alcançar o seu sítio alvo [Terlizzi *et al.*, 2017].

Isolados de UPEC empregam fímbrias do tipo chaperonina/usher, tais como: fímbria do tipo I, fímbria P e fímbria F1C para aderir e invadir as células do epitélio urinário, colonizando o hospedeiro [Krogfelt *et al.*, 1990].

A fímbria tipo 1 é um polímero com cerca de 100 unidades de pilina (FimA), uma proteína contendo aminoácidos hidrofóbicos. A estrutura fimbrial apresenta tipos sorológicos diversos sendo codificada por um cluster contendo nove genes cuja expressão é regulada pelo fenômeno de variação de fase, por ação dos genes *fimB* e *fimE* [Krogfelt *et al.*, 1990]. Os genes *fimA*, *B*, *C* e *D* são estruturais, enquanto *fimF*, *G* e *H* estão envolvidas com a aderência [Krogfelt *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 2000]. A proteína apical FimH adere-se especificamente a resíduos de manose, em especial monomanose presente no epitélio vaginal e da bexiga, além de auxiliar na colonização, a fímbria tipo 1 promove a formação de biofilmes e invasão celular. [Jones *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 2002]. A Invasão permite os isolados de UPEC evitar certas defesas do hospedeiro e tornando-os resistentes para tratamentos com

antibióticos. Um mecanismo de expulsão, depende da expressão do receptor *toll-like 4* (TLR4), defende o uroepitélio da invasão por UPEC. Entretanto, isolados de UPEC podem evitar essa expulsão e multiplicar-se rapidamente, formando comunidades bacterianas intracelulares (CBIs) transitórias que são semelhantes a biofilmes [Anderson *et al.*, 2003]. Após o crescimento bacteriano os isolados de UPEC se dispersam do CBI para invadir outras células, aonde o ciclo se repete. A formação CBI é um mecanismo comum para isolados clínicos de UPEC e observado em células uroepiteliais esfoliadas na urina de pacientes com ITUs agudas [Flores-Mireles *et al.*, 2015].

Fímbria P possui especificidade de ligação aos resíduos de galactobiose que compõem os glicoesfingolipídeos. Sua morfologia é muito semelhante a fímbria tipo 1; e os 11 genes envolvidos na biogênese das fímbrias P são designados *pap* (*pyelonephritis associated pili*) devido à sua associação com isolados de pielonefrite [Svanborg *et al.*, 1987]. A proteína PapA compõe a estrutura fimbrial básica, e as proteínas PapE, F e G, apicais, são essenciais para a adesão, tendo PapG como proteína responsável pela ligação ao receptor celular, com três variantes genéticas do gene *papG*, uma delas, *papGII*, é prevalente entre as cepas pielonefritogênicas e bacteriêmicas, enquanto *papGIII* associa-se às prostatites e cistites [Johnson *et al.*, 2002; Kuehn *et al.*, 1992].

A adesina F1C são fímbrias não hemaglutinantes, que promovem a adesão da bactéria às células epiteliais dos rins, ureteres e bexiga que, em resposta, produzem a citocina pró-inflamatória IL-8 [Bäckhed *et al.*, 2002]. O operon *foc* é composto de seis genes envolvidos na biogênese de F1C, embora tenham similaridade genética com os genes *sfa* da fímbria S, seus receptores não são os mesmos. F1C liga-se a ceramidas diversas (glucosilceramidas, galactosilceramidas, lactosilceramidas, entre outras) cuja composição determinará a especificidade da ligação [Bäckhed *et al.*, 2002].

O flagelo em UPEC permite que as bactérias se movam de forma ascendente no trato urinário, desde a bexiga até os rins. A expressão coordenada das fímbrias tipo1, P e do flagelo, nas diversas etapas da infecção, permite que a bactéria alcance os rins [Lane *et al.*, 2005].

A fímbria S possui atividade hemaglutinante e foi descoberta em isolados de *E. coli* isoladas de pielonefrite. Seu nome advém da especificidade de ligação por galactosídeos contendo ácido siálico. A proteína SfaS é a responsável pela ligação ao receptor celular [Moch *et al.*, 1987; Schmoll *et al.*, 1989]. Um conjunto de sete genes está envolvido na biogênese das fímbrias S. Os genes *sfa* (*S fimbrial adhesins*) parecem ter sua expressão regulada por fatores ambientais, tais como, temperatura, osmolaridade e concentração de glicose. Além de ocorrer

em cerca de 50 % dos isolados de UPEC, em particular, os obtidos de pielonefrite aguda [Morschhäuser *et al.*, 1993; Foxman *et al.*, 1995].

Três tipos principais de toxinas são produzidos por UPEC: hemolisina, fator necrosante citotóxico 1 (CNF1) e toxinas autotransportadoras [Boehm *et al.*, 1990]. A alfa-hemolisina é uma exotoxina codificada pelo operon *hlyCABD* que, ao aderir-se a célula alvo, insere-se na membrana citoplasmática formando poros que facilitam a liberação de nutrientes e íons ferro. Tem especificidade para uma variedade de tipos celulares como: hemácias, fibroblastos, granulócitos, linfócitos e macrófagos. A ação sobre as células fagocíticas permite que a bactéria escape das defesas do hospedeiro. No decurso da infecção por UPEC, a HlyA pode auxiliar na apoptose e esfoliação do uroepitélio, favorecendo a disseminação bacteriana [Trifillis *et al.*, 1994].

CNF1, fator citotóxico necrotizante tipo1, é uma toxina com ação necrotóxica em diversos tecidos do hospedeiro, codificada por um único gene (*cnf1*) [Boquet *et al.*, 2001]. A CNF1, após ligar-se ao seu receptor na célula alvo, sofre endocitose e libera sua parte catalítica no citosol, promovendo a reorganização do citoesqueleto de actina de células epiteliais cultivadas *in vitro*, por meio da ativação permanente de Rho GTPases, com consequente modificação de várias propriedades funcionais das células. Na bexiga, CNF1 contribui para a invasão do epitélio da célula bacteriana, promovendo as infecções urinárias recorrentes [Lemonnier *et al.*, 2007].

Proteínas autotransportadoras como a proteína Sat (toxina autotransportadora secretada) é uma serinoprotease que medeia os efeitos citopáticos na bexiga em linhagens celulares renais cultivadas *in vitro*, e promove danos nos tecidos [Parham *et al.*, 2004; Heimer *et al.*, 2004]. Hemaglutinina sensível à temperatura (Tsh) não exibe atividade de serina-protease e parece ser mais relacionado ao Vat, uma toxina autotransportadora vacuolar encontrada em *E. coli* patogênica aviária [Heimer *et al.*, 2004].

O ferro, um nutriente essencial para todos os seres vivos, é disputado pelas células do hospedeiro e pelos patógenos bacterianos, UPEC não é exceção, e o seu genoma contém pelo menos 10 sistemas caracterizados de absorção de ferro e vários transportadores, promovendo uma concorrência pelo recurso [Welch *et al.*, 2012]. Um exemplo é o sideróforo enterobactina que representa um mecanismo de aquisição de ferro. No entanto, a proteína hospedeira lipocalina 2, que é expressa e liberada por neutrófilos, liga-se e sequestra a enterobactina, tornando-a incapaz de fornecer o ferro para a célula bacteriana. UPEC, entretanto é capaz de modificar a enterobactina por glicosilação, produzindo salmochelina que não é reconhecida e sequestrado pela lipocalina 2, permitindo assim, seu escape do mecanismo de defesa do

hospedeiro mediado por lipocalina 2 [Hantke *et al.*, 2003]. A captação de heme, enterobactina e outros sideróforos contribuem para o estabelecimento da UPEC durante a infecção [Snyder *et al.*, 2004; Hagan *et al.*, 2010].

A combinação de fatores de virulência presentes em isolados distintos de *E. coli*, características sorológicas e doenças que causam são utilizados como determinantes para a classificação dos diferentes patótipos de *E. coli* diarreio gênica (DEC), sendo esses isolados dividido em seis grupos patogênicos bem definidos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). Estudos mais recentes, de caracterização molecular, têm demonstrado que marcadores de virulência podem transitar entre os diferentes grupos patogênicos, assim ocorrendo novas combinações de virulência. [Kaper *et al.*, 2004; Rasko *et al.*, 2008; Kaper *et al.*, 2014; Lara *et al.*, 2017].

Escherichia coli enteroagregativa compreende a categoria de DEC caracterizada por apresentar um padrão de adesão denominado adesão agregativa (AA), aonde as bactérias se apresentam aderidas umas às outras formando uma configuração que lembra tijolos empilhados [Nataro *et al.*, 1987]. Até o momento foram descritas cinco fimbrias agregativas (AAF) responsáveis por mediar o padrão AA na aderência de isolados do patótipo EAEC as células epiteliais cultivadas *in vitro*. Essas fimbrias são denominadas: AAF/I, AAF/II, AAF/III, AAF/IV e AAF/V [Nataro *et al.*, 1992; Czeckulin *et al.*, 1999; Boisen *et al.*, 2008; Jønsson *et al.*, 2015]. *E. coli* são classificadas como EAEC caso sejam portadoras do plasmídeo de virulência pAA que alberga os genes *aatA* e *aggR*, podendo também albergar outros genes de virulência específicos de EAEC (*aggA*, *aafA*, *agg3A*, *agg4A*, *agg5A*, *pet*, *aap*) [Lara *et al.*, 2017].

A plasticidade do genoma apresentada pela espécie *E. coli* é um dos fatores que levou ao surgimento de isolados com um arranjo de fatores de virulência incomum, sendo identificados fatores de virulência de diferentes patótipos em único isolado. Isolados de UPEC apresentando marcadores de virulência originalmente descritos no patótipo EAEC, assim como o padrão AA em células epiteliais cultivadas *in vitro*, tem sido observados [Abe *et al.*, 2008; Toval *et al.*, 2014; Aurass *et al.*, 2011; Olesen *et al.*, 2011; Prager *et al.*, 2014; Ang *et al.*, 2016].

Um fator importante é o aumento de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae que apresentam resistência a antibióticos, incluindo a bactéria *E. coli*. Estas situações são de grande importância principalmente em países em desenvolvimento onde enteropatógenos são causas de infecções frequentes, incluindo as infecções do trato urinário, que podem levar a morte [Talukdar *et al.*, 2013]. Ciprofloxacina têm sido o antimicrobiano mais amplamente

utilizado nas últimas décadas [Hopkins *et al.*, 2015], sendo o principal antimicrobiano utilizado para o tratamento de infecções urinárias, incluindo as pielonefrites [Oliphant *et al.*, 2002]. As quinolonas inibem a síntese de DNA bacteriano e, em concentrações elevadas, inibem também a síntese de RNA. Esses efeitos são mediados pela habilidade destes compostos em desestabilizar o complexo formado entre o DNA e a DNA girase [Hooper, 2001].

A definição de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) não é precisa, geralmente são definidas como beta-lactamases que hidrolisam o anel beta-lactâmico penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, inativando assim esses antibióticos [Paterson *et al.*, 2005]. ESBLs são encontrados principalmente nas espécies *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* [Ambler *et al.*, 1991]. A classificação das ESBLs pode ser realizada através de dois sistemas: a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros [Ambler *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1995]. No sistema de Ambler, as beta-lactamases são divididas em quatro classes, as classes A, C e D são constituídas de serina-betalactamases e da classe B são compostas por metalo-betalactamases [Ambler *et al.*, 1991]. A classificação pelo sistema de Bush-Jacoby-Medeiros agrupa as beta-lactamases de acordo com a similaridade funcional destas enzimas, sendo este sistema mais relevante para o diagnóstico laboratorial, visto que este sistema leva em consideração os inibidores e substratos das betalactamases [Paterson *et al.*, 2005; Bush *et al.*, 1995]. Os genes responsáveis por codificar estas enzimas podem estar presentes no cromossomo, ou podem ser plasmidiais com o potencial de transitarem entre populações bacterianas [Dhillon *et al.*, 2012]. Existem vários genótipos de ESBLs clinicamente importantes, os genótipos SHV, TEM e CTX-M são encontrados com maior frequência [Rupp *et al.*, 2003]. O maior grupo de ESBLs são os CTX-Ms cujo nome é proveniente da sua potente atividade hidrolítica contra cefotaxima. CTX-M foi identificado primariamente na Alemanha, França e América do Sul, ocorrendo um aumento da sua prevalência desde 2000, os genótipos mais predominantes são *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{CTX-M2} e *bla*_{CTX-M14} [Bevan *et al.*, 2017]. As ESBLs do tipo TEM são derivadas do TEM-1 e TEM-2, TEM-1 é capaz de hidrolisar a ampicilina a uma taxa maior que a carbenicilina, oxacilina ou cefalotina e tem atividade desprezível contra as cefalosporinas de espectro estendido sendo inibido pelo ácido clavulânico. TEM-2 tem o mesmo perfil hidrolítico que TEM-1, mas difere de TEM-1 por ter um promotor nativo mais ativo e por uma diferença no ponto isoelétrico [Datta *et al.*, 1965; Jacoby *et al.*, 1991]. ESBLs do tipo SHV foram detectadas em várias bactérias da família *Enterobacteriaceae*, e surtos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Actinobacter ssp.* produtoras de SHV foram reportados [Huang *et al.*, 2016; Poirel *et al.*, 2004]. A prevalência de isolados de UPEC produtores de ESBLs aumentou significativamente na última década, ficando o tratamento dessas infecções bastante

complicado devido à resistência desses isolados a várias classes de antimicrobianos, incluindo: aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e trimetoprim/sulfametoxazol [Falagas *et al.*, 2009].

8. Conclusão

Nossos dados mostraram que os isolados de UPEC albergam uma grande variedade de fatores de virulência, e foram classificados em vários grupos filogenéticos de *E. coli*. O predomínio de UPEC identificado no filogrupo B2, associado à observação do vasto número de genes responsáveis por codificar fatores de virulência presentes nesses isolados, talvez explique o sucesso de UPEC do filogrupo B2 na colonização e sobrevivência nas células epiteliais do sistema urinário do hospedeiro.

Ademais, alguns isolados foram portadores de marcadores de DEC, o que sugere que infecções assintomáticas do trato gastrointestinal por DEC possa constituir uma importante fonte para as ITUs. Além disso, o aumento do número de isolados de UPEC resistentes a alguns dos antimicrobianos testados pode servir como um alerta para os profissionais da área da saúde a fim de selecionar de forma mais adequada o tratamento das ITUs.

9. Referências

1. Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A. M., Blanco, J., Blanco, J. E., et al. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 397–406. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x
2. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 1991 May 15;276 (Pt 1):269-70.
3. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003 Jul 4;301(5629):105-7.
4. Andrade, F. B., Gomes, T. A., & Elias, W. P. (2014). A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods*, 106, 16-18.
5. Ang, C. W., Bouts, A. H., Rossen, J. W., Van der Kuip, M., Van Heerde, M., and Bökenkamp, A. (2016). Diarrhea, urosepsis and hemolytic uremic syndrome caused by the same heteropathogenic *Escherichia coli* strain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 35, 1045–1047. doi: 10.1097/INF.0000000000001226
6. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Extended-Spectrum b-Lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Isolates from Urinary Tract Infections in Southern Brazil
7. Aurass, P., Prager, R., and Flieger, A. (2011). EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environ. Microbiol.* 13, 3139–3148. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02604.x
8. Bäckhed F, Alsén B, Roche N, Angström J, von Euler A, Breimer ME, Westerlund-Wikström B, Teneberg S, Richter-Dahlfors A. Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem.* 2002 May 17;277(20):18198-205. Epub 2002 Mar 4
9. Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496.
10. Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011 62: 1-10
11. Bernier, C., Gounon, P., & Le Bouguéneq, C. (2002). Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infection and immunity*, 70(8), 4302-4311.
12. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Aug 1;72(8):2145-2155. doi: 10.1093/jac/dkx146.
13. Boehm DF, Welch RA, Snyder IS. Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect Immun.* 1990 Jun;58(6):1959-64.

14. Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP (2008) New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun* 76(7):3281-92.
15. Boisen, N., Ruiz-Perez, F., Scheutz, F., Krogfelt, K. A., & Nataro, J. P. (2009). High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(2), 294-301.
16. Boquet P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*. 2001 Nov;39(11):1673-80.
17. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun;39(6):1211-33.
18. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013;5:58-65.
19. Clermont, O., Dixit, O. V., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., ... & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental microbiology*, 21(8), 3107-3117.
20. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 28th Informational Supplement. CLSI Document M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018:2018.
21. Cyويا PS, Rodrigues GR, Nishio EK, Medeiros LP, Koga VL, Pereira AP, Vespero EC, Houle S, Dozois CM, Nakazato G, Kobayashi RK. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Oct 29;9(10):1068-75.
22. Czezulian JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999;67:2692-9.
23. da Silva, Rafaella Christina Rocha Moreira, et al. "Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasilia, Brazil." *Journal of global antimicrobial resistance* 9 (2017): 61-67.
24. Daga, Ana Paula, et al. "Escherichia coli bloodstream infection in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 9 (2019): 191.
25. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. 1965 Oct 16;208(5007):239-41
26. Dezfulian H, Batisson I, Fairbrother JM, Lau PC, Nassar A, Szatmari G, et al. Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs. *J Clin Microbiol* 2003;41:1375-85.
27. Dhillon RH, Clark J. ESBLs: A Clear and Present Danger? *Crit Care Res Pract*. 2012;2012:625170. doi: 10.1155/2012/625170. Epub 2011 Jun 6
28. Dormanesh, B., Dehkordi, F. S., Hosseini, S., Momtaz, H., Mirnejad, R., Hoseini, M. J., ... & Darian, E. K. (2014). Virulence factors and o-serogroups profiles of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Iranian pediatric patients. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(2).

29. ELIAS, W. P., SUZART, S., TRABULSI, L. R., NATARO, J. P., & GOMES, T. A. (1999). Distribution of aggA and aafA gene sequences among Escherichia coli isolates with genotypic or phenotypic characteristics, or both, of enteroaggregative E. coli. *Journal of medical microbiology*, 48(6), 597-599.
30. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol* 2004;104:91-101.
31. Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H. C., & Wieler, L. H. (2005). Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian diseases*, 49(2), 269-273.
32. Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kießling, S., Alt, K., Antão, E. M., ... & Böhnke, U. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(3), 163-176.
33. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect*. 2009 Dec;73(4):345-54. doi: 10.1016/j.jhin.2009.02.021. Epub 2009 Jul 10
34. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., and Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 269–284. doi: 10.1038/nrmicro3432
35. Foxman B, Zhang L, Palin K, Tallman P, Marrs CF. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J Infect Dis*. 1995 Jun;171(6):1514-21
36. Foxman B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol*. 2010 Dec;7(12):653-60. doi: 10.1038/nrurol.2010.190.
37. Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 28, 1–13. doi: 10.1016/j.idc.2013.09.003
38. Gao, Q., Zhang, D., Ye, Z., Zhu, X., Yang, W., Dong, L., ... & Liu, X. (2017). Virulence traits and pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli* isolates with common and uncommon O serotypes. *Microbial pathogenesis*, 104, 217-224.
39. Gioppo, N. M., Elias Jr, W. P., Vidotto, M. C., Linhares, R. E., Saridakis, H. O., Gomes, T. A., ... & Pelayo, J. S. (2000). Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. *FEMS microbiology letters*, 190(2), 293-298.
40. Grude N, Potaturkina-Nesterova NI, Jenkins A, Strand L, Nowrouzian FL, Nyhus J, Kristiansen BE (2007) A comparison of phylogenetic group, virulence factors and antibiotic resistance in Russian and Norwegian isolates of *Escherichia coli* from urinary tract infection. *Clin Microbiol Infect* 13: 208-211.
41. Hagan, E. C., Lloyd, A. L., Rasko, D. A., Faerber, G. J., & Mobley, H. L. (2010). *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS pathogens*, 6(11), e1001187.
42. Hahn E, Wild P, Hermanns U, Sebbel P, Glockshuber R, Hänner M, Taschner N, Burkhard P, Aebi U, Müller SA. Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol*. 2002 Nov 8;323(5):845-57

43. Hanson, Nancy D., et al. "Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 β -lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a US community." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52.10 (2008): 3814-3816.
44. Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3677-82. Epub 2003 Mar 24
45. Heimer SR, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL. Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect Immun*. 2004 Jan;72(1):593-7.
46. Hernandez RT, Velsko I, Sampaio SC, Elias WP, Robins-Browne RM, Gomes TA, et al. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:8391-9.
47. Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2001 Mar 15;32 Suppl 1:S9-S15.
48. Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International journal of antimicrobial agents*, 25(5), 358-373.
49. Huang B, Wang Q, Deng C, Wang J, Yang T, Huang S, Su XZ, Liu Y, Pan L, Li G, Li D, Zhang H, Bacar A, Abdallah KS, Attoumane R, Mliva AM, Zheng S, Xu Q, Lu F, Guan Y, Song J. Prevalence of crt and mdr-1 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Grande Comore island after withdrawal of chloroquine. *Malar J*. 2016 Aug 15;15(1):414. doi: 10.1186/s12936-016-1474-4.
50. Issakhanian, L., & Behzadi, P. (2019). Antimicrobial Agents and Urinary Tract Infections. *Current pharmaceutical design*.
51. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirliff ME. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jan;21(1):26-59. doi: 10.1128/CMR.00019-07.
52. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Sep;35(9):1697-704.
53. Johnson JR, O'Bryan TT, Low DA, Ling G, Delavari P, Fasching C, et al. Evidence of Commonality between Canine and Human Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains That Express papG Allele III. *Infect Immun* 2000a;68: 3327–3336.
54. 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* 2000b;68:3040-7.
55. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". *J Lab Clin Med*. 2002 Mar;139(3):155-62
56. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000;181:261-72.

57. Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J., & Nolan, L. K. (2006). DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of bacteriology*, 188(2), 745-758.
58. Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes AV, Abraham SN, Hultgren SJ. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 14;92(6):2081-5.
59. Jønsson R, Struve C, Boisen N, Mateiu RV, Santiago AE, Jenssen H, Nataro JP, Krogfelt KA (2015) Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 83(4):1396-405.
60. Jønsson, R., Struve, C., Boisen, N., Mateiu, R. V., Santiago, A. E., Jenssen, H., ... & Krogfelt, K. A. (2015). Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 83(4), 1396-1405.
61. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol* 2004; 2:123-40.
62. Kaper JB, O'Brien AD. Overview and Historical Perspectives. *MicrobiolSpectr*. 2014 Dec;2(6).
63. Kim, D. H., Subhadra, B., Kang, H. Y., Woo, K., Kim, J., Son, Y. J., ... & Choi, C. H. (2018). Virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection in Korea. *Genes & genomics*, 40(6), 625-634.
64. Kline KA, Schwartz DJ, Lewis WG, Hultgren SJ, Lewis AL.(2011). Immune activation and suppression by group B streptococcus in a murine model of urinary tract infection. *Infect Immun*. 2011 Sep;79(9):3588-95. doi: 10.1128/IAI.00122-11. Epub 2011 Jun 20.
65. Koga VL, Tomazetto G, Cyويا PS, Neves MS, Vidotto MC, Nakazato G, Kobayashi RKT. (2014) Molecular Screening of Virulence Genes in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Human Blood Culture in Brazil. *Biomed Res Int*. 2014;2014:465054.
66. Kot, B., Wicha, J., Gruzewska, A., Piechota, M., Wolska, K., & Obrebska, M. (2016). Virulence factors, biofilm-forming ability, and antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* strains isolated from hospitalized patients. *Turkish journal of medical sciences*, 46(6), 1908-1914.
67. Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun*. 1990 Jun;58(6):1995-8.
68. Kuehn MJ, Heuser J, Normark S, Hultgren SJ. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips *Nature*. 1992 Mar 19;356(6366):252-5.
69. Lane MC, Lockatell V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel JR, Johnson DE, Mobley HL Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun*. 2005 Nov;73(11):7644-56
70. Lara FB, Nery DR., De Oliveira PM., Araujo ML., Carvalho FR., Messias-Silva LC, et al.. Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections.2017 *Front. Microbiol*. 8:146.
71. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1189-93.

72. Lee, J. H., Subhadra, B., Son, Y. J., Kim, D. H., Park, H. S., Kim, J. M., ... & Choi, C. H. (2016). Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Letters in applied microbiology*, 62(1), 84-90.
73. Lemonnier M, Landraud L, Lemichez E. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 Sep;31(5):515-34. Epub 2007 Aug 3.
74. Levison ME, Kaye D. (2013). Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. *Curr Infect Dis Rep.* 2013 Apr;15(2):109-15. doi: 10.1007/s11908-013-0315-7.
75. Lindstedt, Bjørn-Arne, et al. "High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples." *BMC infectious diseases* 18.1 (2018): 544.
76. López-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández ÁH, ArroyoEscalante S, Moncada-Barrón D, Villanueva-Recillas S, Xicohtencatl-Cortes J, Hernández-Castro R (2014) Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *Biomed Res Int* 2014: 959206.
77. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
78. Malekzadegan, Y., Khashei, R., Ebrahim-Saraie, H. S., & Jahanabadi, Z. (2018). Distribution of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iranian patients. *BMC infectious diseases*, 18(1), 572.
79. Martinez, Juan J., et al. "Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells." *The EMBO journal* 19.12 (2000): 2803-2812.
80. Moch T, Hoschützky H, Hacker J, Kröncke KD, Jann K. Isolation and characterization of the alpha-sialyl-beta-2,3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 May;84(10):3462-6
81. Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Dehkordi, F. S., Ranjbar, R., Sarshar, M., & Souod, N. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 12(1), 8.
82. Moreno E, Planells I, Prats G, Planes AM, Moreno G, Andreu A. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 53, no. 2, pp. 93–99, 2005
83. Morschhäuser J, Uhlin BE, Hacker J. Transcriptional analysis and regulation of the *sfa* determinant coding for S fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol Gen Genet.* 1993 Apr;238(1-2):97-105.
84. Munkhdelger, Y., Gunregjav, N., Dorjpurev, A., Juniichiro, N., & Sarantuya, J. (2017). Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(01), 51-57.

85. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM (1992) Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 60(6):2297-304.
86. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6:829-831.
87. Nielubowicz GR, Mobley HL.(2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol*. 2010 Aug;7(8):430-41. doi: 10.1038/nrurol.2010.101. Epub 2010 Jul 20.
88. Nogueira, Keite da Silva, et al. "Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48.2 (2015): 162-169.
89. Nuutinen, M., and Uhari, M. (2001). Recurrence and follow-up after urinary tract infection under the age of 1 year. *Pediatr. Nephrol.* 16, 69–72. doi: 10.1007/s004670000493
90. Olesen, B., Scheutz, F., Andersen, R. L., Menard, M., Boisen, N., Johnston, B., et al. (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the Cause of an outbreak of urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3703–3711. doi: 10.1128/JCM.01909-12
91. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician*. 2002 Feb 1;65(3):455-64.
92. Oliveira, F. A., Paludo, K. S., Arend, L. N., Farah, S. M., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., ... & Fadel-Picheth, C. M. (2011). Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genet Mol Res*, 10(4), 4114-25.
93. Paiva AL, Lincopan N, Silva KC, Neves PR, Moreno AM, McCulloch JA, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJ Low-virulence phylogenetic background of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *J Infect Dev Ctries* 2013 7: 756-760. doi:10.3855/jidc.3781
94. Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Rodríguez-Moctezuma, J. R., Domínguez-Trejo, P., Vaca-Paniagua, F., & Vaca, S. (2017). Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(4), 478-485.
95. Parham NJ, Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF, Henderson IR. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Jan 15;230(1):73-83.
96. Parham, N., Spencer, J., Taylor, D., Ternent, H., Innocent, G., Mellor, D., ... & Williams, A. (2003). An adapted immunomagnetic cell separation method for use in quantification of *Escherichia coli* O157: H7 from bovine faeces. *Journal of microbiological methods*, 53(1), 1-9.
97. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Oct;18(4):657-86.
98. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*. 2006 Jun;34(5 Suppl 1):S20-8; discussion S64-73.
99. Pitout, Johann DD, et al. "Population-based laboratory surveillance for AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary." *Emerging infectious diseases* 13.3 (2007): 443.

100. Poirel L, Mammeri H, Nordmann P TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type beta-lactamase from *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Dec;48(12):4528-31.
101. Prager, R., Lang, C., Aurass, P., Fruth, A., Tietze, E., and Flieger, A. (2014). Two novel EHEC/EAEC hybrid strains isolated from human infections. *PLoS ONE* 9:e95379. doi: 10.1371/journal.pone.0095379
102. Qin, X., Hu, F., Wu, S., Ye, X., Zhu, D., Zhang, Y., & Wang, M. (2013). Comparison of adhesin genes and antimicrobial susceptibilities between uropathogenic and intestinal commensal *Escherichia coli* strains. *PLoS One*, 8(4), e61169.
103. Rahdar, M., Rashki, A., Miri, H. R., & Ghalehnoo, M. R. (2015). Detection of pap, sfa, afa, foc, and fim adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates collected from patients with urinary tract infection. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(8).
104. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R, Henderson IR, Sperandio V, Ravel J. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol*. 2008 Oct;190(20):6881-93
105. Restieri, C., Garriss, G., Locas, M. C., & Dozois, C. M. (2007). Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(5), 1553-1562.
106. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* 2005;36:241-56.
107. Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*. 2003;63(4):353-65.
108. Santos AC, Zidko AC, Pignatari AC, Silva RM. Assessing the diversity of the virulence potential of *Escherichia coli* isolated from bacteremia in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2013;46:968-73.
109. Savarino, S. J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B. M., Levine, M. M., Guandalini, S., & Guerry, P. (1993). Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 3093-3097.
110. Schmoll T, Hoschützky H, Morschhäuser J, Lottspeich F, Jann K, Hacker J. Analysis of genes coding for the sialic acid-binding adhesin and two other minor fimbrial subunits of the S-fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1989 Dec;3(12):1735-44.
111. Sharma PC, Jain A, Jain S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm*. 2009 Nov-Dec;66(6):587-604.
112. Skjøl-Rasmussen, L., Olsen, S. S., Jakobsen, L., Ejrnaes, K., Scheutz, F., Lundgren, B., ... & Hammerum, A. M. (2013). *Escherichia coli* clonal group A causing bacteraemia of urinary tract origin. *Clinical microbiology and infection*, 19(7), 656-661.
113. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockatell CV, Johnson DE, Sonnenberg MS, Welch RA, Mobley HL. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6373-81
114. Stamm WE (2002). Scientific and clinical challenges in the management of urinary tract infections. *Am J Med*. 2002 Jul 8;113 Suppl 1A:1S-4S.

115. Stamm WE and Hooton TM (1993). Management of urinary tract infections in adults. *N Engl J Med.* 1993 Oct 28;329(18):1328-34
116. Stamm WE, Hooton TM, Johnson JR, Johnson C, Stapleton A, Roberts PL, Moseley SL, Finn SD. (1989). Urinary Tract Infections: From Pathogenesis to Treatment. *The Journal Of Infectious Diseases.* VOL. 159, NO. 3 . March.
117. Svanborg Eden C, Andersson B, Aniansson G, Leffler H, Lomberg H, Mestecky J, Wold AE. Glycoconjugate receptors for bacteria attaching to mucosal sites: examples for *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*. *Adv Exp Med Biol.* 1987;216B:931-9.
118. Szalo IM, Goffaux F, Pirson V, Piérard D, Ball H, Mainil J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. *Res Microbiol* 2002;153:653-8.
119. Tabasi M, Karam MR, Habibi M, Mostafavi E, Bouzari S. (2016) Genotypic Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Acute Cystitis, Pyelonephritis and Asymptomatic Bacteriuria. *J ClinDiagn Res.* 2016 Dec;10(12):DC01-DC07.
120. Talukdar PK, Rahman M, Rahman M, Nabi A, Islam Z, Hoque MM, Endtz HP, Islam MA. Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh. *PLoS One.* 2013;8(4):e61090.
121. Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W., & Boukadida, J. (2013). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(6), e450-e453.
122. Tennant, S. M., Tauschek, M., Azzopardi, K., Bigham, A., Bennett-Wood, V., Hartland, E. L., ... & Robins-Browne, R. M. (2009). Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC microbiology*, 9(1), 117.
123. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. (2017) UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol.* 2017 Aug 15;8:1566.
124. Tharwat, N., El-Sherif, R., Elnagdy, S., Marzaban, R., & Amer, S. (2019). Virulent *Escherichia coli* strains among Egyptian patients with acute diarrhoea versus urinary tract infection, and their antibiotic susceptibility. *Arab Journal of Gastroenterology.*
125. Tiba, Monique Ribeiro, Tomomasa Yano, and Domingos da Silva Leite. "Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50.5 (2008): 255-260.
126. Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. EPM-modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofanodesaminase. *RevMicrobiol*1982a;13:309-15.
127. Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. MILi-um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *RevMicrobiol*1982b;13:230-5.
128. Tolg, C., and Bagli, D. J. (2012). Uropathogenic *Escherichia coli* infection: potential importance of epigenetics. *Epigenomics*4, 229–235. doi: 10.2217/epi.12.5

129. Toval F., Köhler CD., Vogel U., Wagenlehner F, Mellmann A., Fruth A, et al. (2014). Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 52, 407–418.
130. Trifillis AL, Donnenberg MS, Cui X, Russell RG, Utsalo SJ, Mobley HL, Warren JW. Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. *Kidney Int.* 1994 Oct;46(4):1083-91.
131. Welch RA, Burland V, Plunkett G 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HL, Donnenberg MS, Blattner FR. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 24;99(26):17020-4. Epub 2002 Dec 5.
132. Woodford, Neil, et al. "Wide geographic spread of diverse acquired AmpC β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59.1 (2007): 102-105.
133. Wu XR, Sun TT, Medina JJ. In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9630-5.
134. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995;12:85-90.