

A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro

Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence regarding host age and sex
La virulencia de *Escherichia coli* (ExPEC) patogênica intrainestinal en relación a la edad y al sexo del hospedero

Ana Carolina de Mello Santos*
Antonio Carlos Campos Pignatari***
Rosa Maria Silva*****

Ana Carolina Matos Zidko**
Ana Cristina Gales****

RESUMO: A *Escherichia coli* é, entre os bacilos Gram-negativos, o principal agente etiológico de infecções da corrente sanguínea, seja comunitárias seja as nosocomiais. Uma vez que são poucos os trabalhos que pesquisaram a virulência de amostras de *E. coli* isoladas de bacteremia no Brasil, este trabalho teve por objetivo investigar os fatores de virulência frequentes em amostras isoladas de seres humanos hospitalizados bem como a origem filogenética destas amostras, relacionando essas características bacterianas com características do hospedeiro como sexo e idade. A pesquisa da origem filogenética das amostras foi realizada utilizando-se a técnica da PCR e a pesquisa de fatores de virulência por hibridação de colônias com sondas radioativas. O resultado obtido com a pesquisa de 20 fatores de virulência demonstrou que os fatores relacionados à fimbria tipo 1, ao sistema yersiniabactina de aquisição de ferro e à produção de cápsula, foram os mais frequentes nas amostras estudadas. Além disso, a grande maioria das amostras foi classificada nos grupos filogenéticos B2 e D. Em relação às características do hospedeiro, foi possível estabelecer uma relação positiva entre amostras mais virulentas e infecções em pacientes do sexo feminino. Contudo, não houve diferença na virulência das amostras em relação à idade do hospedeiro. Estes dados sugerem que as amostras que causam infecções extra-intestinais em pacientes do sexo feminino são, em geral, mais virulentas do que aquelas que causam infecções nos pacientes do sexo masculino. Por outro lado, a idade não parece ter correlação com a virulência da amostra infectante.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*. Bacteremia. Infecção extra-intestinal.

ABSTRACT: *E. coli* is the Gram-negative rod most important cause of bacteremia both in the community and in the hospital environment. Since the reports on virulence of *E. coli* isolated from the bloodstream are rare in Brazil, this work aimed to investigate isolates from hospitalized patients in regard to the frequency of their virulence factors, and phylogeny, as well as their relationship with the sex and age of the patients. The analysis of phylogenetic relationship was done by PCR, and the search for virulence factors by colony hybridization. Most of the strains were classified in phylogenetic groups B2 and D. Among 20 virulence traits searched, the most frequent were related to Type 1 fimbriae, yersiniabactin iron acquisition system, and capsule. The most virulent strains were found in the female gender, while age seemed not to have any connection with the virulence of the isolates. These data suggest that *E. coli* strains causing bacteremia in female patients are more virulent than those able to cause the same infection in man. The same is not seen in regard to the age of the patients.

KEYWORDS: *Escherichia coli*. Bacteremia. Extraintestinal pathogenic.

RESUMEN: *Escherichia Coli* es, entre los bacilos gram negativos, el agente etiológico principal de infecciones de la cadena sanguínea, sean comunitarias o nosocomiales. Como son pocos los trabajos que han estudiado la virulencia de muestras de *Escherichia Coli* aisladas de bacteremia en Brasil, este trabajo tiene el objetivo de investigar los factores frecuentes de virulencia en muestras aisladas de seres humanos hospitalizados así bien el del filogenética de estas muestras, relacionando estas características bacterianas con las características sexo y edad del hospedero. La investigación del origen filogenética de las muestras fue realizada utilizando la técnica de reacción en cadena de polimerasa y la investigación de factores de virulencia mediante hibridación de colonias con sondas radioactivas. El resultado conseguido con la investigación de 20 factores de virulencia demostró que los factores relacionados a las fimbrias tipo 1, al sistema yersiniabactina de adquisición del hierro y a la producción de cápsula fueran los más frecuentes en las muestras estudiadas. Por otra parte, se clasificaron a la gran mayoría de las muestras en los grupos filogenéticos B2 y D. En lo referente a las características del hospedero, fue posible establecer una relación positiva entre muestras más virulentas e infecciones en pacientes del sexo femenino. Sin embargo, no hubo diferencia en la virulencia de las muestras en lo referente a la edad del hospedero. Estos datos sugieren que las muestras que causan las infecciones extraintestinales en pacientes del sexo femenino son generalmente más virulentas que las que causan infecciones en pacientes del sexo masculino. Por otra parte, la edad no parece tener correlación con la virulencia de la muestra infectante.

PALABRAS LLAVE: *Escherichia Coli*. Bacteremia. Infecciones extraintestinales.

* Doutoranda em Ciências (Microbiologia e Imunologia). Disciplina de Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo.

** Mestranda em Ciências (Microbiologia e Imunologia). Disciplina de Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo.

*** Médico Livre Docente. Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

**** Médica Doutora em Ciências (Infectologia). Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

***** Doutora em Ciências (Microbiologia e Imunologia). Disciplina de Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo. E-mail: rmsilva01@unifesp.br

Introdução

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa pertencente à Família *Enterobacteriaceae*¹⁶. A grande maioria dessas amostras é pertencente à microbiota intestinal, tanto de seres humanos quanto de animais de sangue quente. No entanto, aproximadamente, 10% são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e infecções extra-intestinais^{14,16,22}. Estudos comparativos de genômica, em particular os que empregam as técnicas de “multilocus enzyme electrophoresis” (MLEE) e “pulsed field gel electrophoresis” (PFGE) têm mostrado que as amostras de *E. coli* divergem quanto a sua origem filogenética. Assim, as amostras comensais (sem potencial patogênico), em sua grande maioria, são grupadas nos grupos filogenéticos A e B1, as amostras patogênicas intestinais agrupam-se igualmente em A, B1 e D. Diferentemente, destas, as amostras patogênicas extra-intestinais são, em sua maioria, oriundas dos filogrupos B2 e D^{9,13,27}.

Os patógenos intestinais são genericamente denominados de DEC (“*Diarrheagenic Escherichia coli*” – *E. coli* diarrreio gênica), e podem ser divididos em patotipos, os quais são geralmente definidos por uma variedade de características como: modo de transmissão, características do hospedeiro afetado, sorotipos e sorogrupos, fenótipos de interação com as células epiteliais intestinais, mecanismos de patogenicidade e determinantes genéticos de virulência. Tendo por base estas características, atualmente são reconhecidos os seguintes patotipos de DEC: EPEC (*E. coli* enteropatógena), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), STEC/EHEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga) e DAEC (*E. coli* difusamente aderente)^{16,22}.

Com relação às *E. coli* patogênicas extra-intestinais, sua denominação mais frequentemente empregada reflete o sítio de isolamento e não as características que definiriam um patotipo, particularmente com relação ao conjunto de marcadores de virulência que possuem. Desta forma, as amostras isoladas de infecção urinária são conhecidas como UPEC (*E. coli* uropatógena), e as isoladas de meningites como MNEC (*E. coli* associada à Meningite Neonatal). Ainda, as amostras isoladas de colibacilose aviária são denominadas APEC (*E. coli* patogênica aviária). Entretanto, sabe-se que, neste caso, amostras isoladas de um determinado sítio podem causar infecções em outros sítios do hospedeiro e até mesmo em hospedeiros diversos. Exemplificando, determinadas amostras de UPEC podem causar meningite neonatal e vice-versa; por outro lado amostras de humanos parecem poder causar infecções em aves e animais domésticos e vice-versa^{11,12,13,20}. Estas incongruências levaram os autores Russo & Johnson²² a propor a denominação de ExPEC (“*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*” – *E. coli* patogênica extra-intestinal), no sentido de englobar todas as amostras de *E. coli* isoladas de infecções extra-intestinais, independentemente do hospedeiro e do sítio de isolamento.

Entre as infecções extra-intestinais causadas por ExPEC, as principais são, as infecções do trato urinário, as meningites, as infecções intra-abdominais, as infecções em feridas e as infecções da corrente sanguínea. Deve-se ressaltar que as ExPEC são o principal agente etiológico das bacteremias causadas por bacilos Gram negativos, tanto em infecções de origem comunitária quanto as de caráter nosocomial (infecções associadas aos serviços de saúde)^{2,23}. Estas infecções não ocorrem na forma de surtos co-

munitários que podem colocar em risco grande número de indivíduos simultaneamente, como ocorre com as DEC. Contudo, revestem-se de grande importância por terem alta morbidade e mortalidade, principalmente no ambiente hospitalar, aonde acometem, no dia a dia, pacientes que já se encontram debilitados e imunologicamente deprimidos, seja por sua doença de base, seja pelos tratamentos a que necessitam ser submetidos.

Apesar de sua enorme importância, somente nesta década intensificou-se o estudo de marcadores genéticos de virulência, com o objetivo de caracterizar melhor seus mecanismos de virulência. Atualmente, há uma lista de cerca de 40 fatores de virulência relacionados, na sua maioria, à colonização do hospedeiro (adesinas/invasinas), à sobrevivência no ambiente extra-intestinal (sistemas de captação de ferro), ao escape das defesas do hospedeiro (fatores que dificultam a fagocitose, ou que promovem resistência ao complemento presente no soro)^{6,14}.

No Brasil, são, raros os trabalhos que empregam métodos moleculares na pesquisa desses fatores de virulência de ExPEC, em particular nas amostras isoladas de bacteremia humana¹. Este trabalho pesquisou a presença de 20 dos mais importantes fatores de virulência de ExPEC em amostras de *E. coli* isoladas de bacteremia humana. Foi estudada também a existência de correlação entre os fatores de virulência encontrados, os grupos filogenéticos das amostras, e a faixa etária e o sexo dos pacientes.

Material e métodos

Amostragem: foram estudadas 74 amostras de *E. coli* isoladas de bacteremia de pacientes internados no Hospital São Paulo (HSP), São Paulo, SP, entre dezembro de 2004

e março de 2006. Todas as amostras foram primariamente isoladas no Laboratório Central do HSP, sob a supervisão da Dra. Antônia Maria de Oliveira Machado, sendo posteriormente armazenadas e congeladas no Banco de Microorganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, sob a supervisão dos Drs. Antonio Carlos Campos Pignatari e Ana Cristina Gales.

Caracterização dos pacientes: para possibilitar a análise das características dos hospedeiros estes foram grupados segundo o sexo e divididos em três faixas etárias: I – pediátrica [entre zero e 18 anos (média de 10 anos)]; II – intermediária [entre 19 e 60 anos (média de 42 anos)], e III – geriátrica [acima de 61 anos (média de 74 anos)].

Classificação filogenética das amostras bacterianas: a origem filogenética das amostras foi determinada seguindo-se a metodologia descrita por Clermont et al.³. Essa classificação baseia-se no padrão de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de dois genes (*chuA* e *yjaA*) e de uma região de DNA (TspE4.C2). Os iniciadores utilizados nas PCRs estão descritos na Tabela 1. De acordo com o resultado das PCR as amostras são classificadas segundo o fluxograma apresentado na Figura 1.

Presença de fatores de virulência: a pesquisa de 20 fatores de virulência (Tabela 1) foi realizada pelo emprego da técnica de hibridação de colônias conforme descrito^{24,26}. Brevemente, as amostras bacterianas foram semeadas, pelo método de placa mestre, em Agar MacConkey, e incubadas em estufa a 37°C por 18h. Após incubação, as colônias foram transferidas para filtro de papel Whatman 541 (Whatman International Ltd - England) os quais foram tratados com soluções de desnaturação e

neutralização para que houvesse rompimento das células bacterianas e exposição de seu genoma. As membranas foram então secas e armazenadas ao abrigo da luz e umidade até o momento da hibridação. As sondas de DNA foram preparadas com fragmentos de DNA específicos para cada fator pesquisado, obtidos por PCR (Tabela 1), os quais foram marcados com nucleotídeo radioativo [α - P³²]-dCTP, utilizando-se o kit de marcação “Ready – to – Go™ DNA Labelling beads (- dCTP)” (ambos de procedência Amersham / GE Healthcare – USA). As sondas radiativamente marcadas foram incubadas com os filtros, a 65 °C, por cerca de 24h. Após o período de hibridação, os filtros foram lavados e expostos a filmes de raio X, a -70 °C, por cerca de 18 horas. Após revelação, os pontos velados no filme raio X representavam as amostras portadoras de sequências homólogas às sondas utilizadas (Figura 2). Para controle do experimento, cada filtro continha amostras bacterianas positivas e negativas para a sonda testada.

Análise estatística: Foi realizada com o emprego do teste exato de Fisher utilizando programas de livre acesso¹⁷, sendo considerado estatisticamente significativo quando $P < 0,05$.

Resultados

Dos 20 fatores de virulência pesquisados, 17 foram encontrados nas amostras estudadas, os quais apresentaram frequências variadas (Tabela 2). Os fatores *fimH*, *irp2*, *chuA*, *kpsMT II*, *iucD* e *traT* foram os mais frequentes e estavam presentes em mais de 60 % das amostras. Ao contrário, os fatores *ompT*, *sfaDE*, *cnf1*, *afaBC*, *KpsMTIII* e *ibe10* ocorreram mais raramente (menos de 20% das amostras). Os marcadores *cf29K*, *bmaE* e *afaE-8* não foram encontrados nesta amostragem.

Em relação à distribuição dos fatores de virulência de acordo com o sexo do hospedeiro, diversas diferenças puderam ser observadas. Entre elas, o fato de que oito marcadores de virulência (*fimH*, *irp2*, *chuA*, *iucD*, *kpsMT II*, *papC*, *traT* e *iha*) ocorreram com frequência acima de 60 % no sexo feminino contra apenas três marcadores (*fimH*, *irp2* e *traT*) no sexo masculino (Tabela 2). Além disso, os dados obtidos mostram que houve associação estatisticamente significativa apenas entre o sexo feminino e os genes *iucD*, *papC*, *iha* e *hlyA*. Não se observou correlação entre o sexo masculino e qualquer dos fatores pesquisados (Tabela 2).

Figura 1. Árvore de classificação filogenética baseada nos resultados das PCR

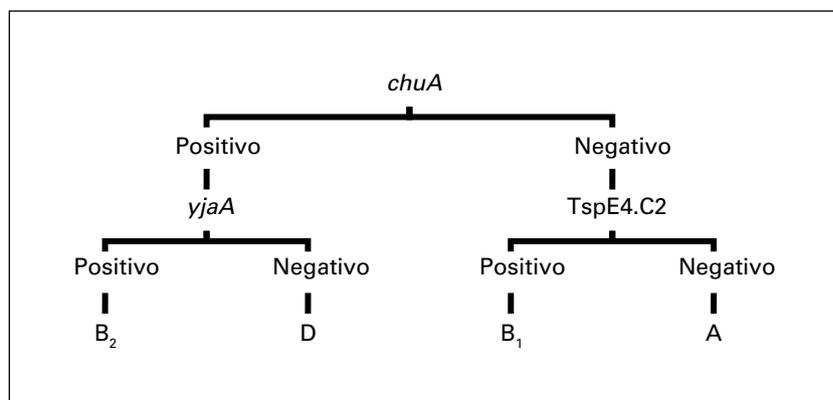


Tabela 1. Condições para obtenção por PCR dos fatores de virulência pesquisados por hibridação de colônias e dos marcadores filogenéticos

Genes alvo	Fator relacionado	Iniciadores (5' - 3')	Amplicon	Referências dos iniciadores
<i>papC</i>	Fímbria P	F: GACGGCTGTAAGTGCAGGGTGTGGCG R: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328 pb	Le bouguenec et al; 1992.
<i>sfaDE</i>	Fímbria S	F: CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA R: CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC	410 pb	Le bouguenec et al; 1992.
<i>afaBC III</i>	Adesina afimbrial -3	F: GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC R: CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	750 pb	Le bouguenec et al; 1992.
<i>afaE-8</i>	Adesina afimbrial -8	F: CTAACCTGCCATGCTGTGACAGTA R: TTATCCCCTGCGTAGTTGTGAATC	302 pb	Lalioui et al; 2001.
<i>iha</i>	Adesina homóloga a irgA de <i>V. cholerae</i>	F: CAGGTCGGGGTTACCAAGT R: CAAATGGCTCTTCCGTCATGC	925 pb	Szalo et al; 2002.
<i>bmaE</i>	Adesina específica do grupo sangüíneo M	F: ATGGCGCTAACTGCCATGCTG R: AGGGGGACATATAGCCCCCTTC	507 pb	Johnson & Stell; 2000.
<i>fimH</i>	Fímbria tipo 1	F: GTTGATCAAACCGTTCAG R: AATAACGCGCCTGGAACG	331 pb	Marc & Dho-moulin; 1996
<i>cf29A</i>	Adesina CF29K de <i>K. pneumoniae</i> e adesina CS31-A de <i>E. coli</i>	F: TCAACAACACTATCAAGGAA R: ACCAAGTGCCTAAGAGGA	572 pb	Este estudo
<i>ibe10</i>	Invasina do endotélio cerebral	F: AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC R: TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170 pb	Huang et al; 1995.
<i>iucD</i>	Sistema aerobactina de aquisição de ferro	F: AAGTGTGATTTTATTGGTGTGTA R: CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	760 pb	Herrero et al; 1988.
<i>irp2</i>	Sistema Yersiniabactina de aquisição de ferro	F: AAGGATTCGCTGTACCGGAC R: TCGTCGGGCAGCGTTTTCTTCT	264 pb	Czeczulin et al; 1999.
<i>iss</i>	Proteína de superfície associada ao aumento da resistência ao soro	F: TCACATAGGATTCTGCCG R: AGAAATCAAAGGTGGCC	607 pb	Dezfulian et al; 2003.
<i>traT</i>	Proteína associada à exclusão de superfície e resistência ao soro	F: GGTGTGGTGCATGAGCACAG R: CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290 pb	Johnson & Stell; 2000.
<i>cvaC</i>	Microcina ColV (bacteriocina)	F: CACACACAAACGGGAGCTGTT R: CTTCCCGCAGCATAGTCCAT	680 pb	Johnson & Stell; 2000.
<i>kpsMT II</i>	Cápsula do grupo 2	F: GCGCATTGCTGATACTGTTG R: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272 pb	Johnson & Stell; 2000.
<i>kpsMT III</i>	Cápsula do grupo 3	F: TCCTCTGCTACTATTCCCCCT R: AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	392 pb	Johnson & Stell; 2000.
<i>ompT</i>	Protease T (proteína de membrana externa)	F: ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC R: CCCGGGTCATAGTGTTCATC	559 pb	Johnson & Stell; 2000b.
<i>hlyA</i>	Alfa-hemolisina	F: AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT R: ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177 pb	Yamamoto et al; 1995.
<i>cnf1</i>	Fator necrotizante citotóxico 1	F: GAACTTATTAAGGATAGT R: CATTATTATAACGCTG	543 pb	Blanco et al; 1996.
<i>chuA</i>	Receptor heme e marcador filogenético	F: GACGAACCAACGGTCAGGAT R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279 pb	Clermont et al; 2000.
<i>TspE4.C2</i>	Marcador filogenético	F: GAGTAATGTGCGGGCATTCA R: CGCGCCAACAAAGTATTACG	152 pb	Clermont et al; 2000.
<i>yjaA</i>	Marcador filogenético	F: TGAAGTGTGAGGAGACGCTG R: ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211 pb	Clermont et al; 2000.

Embora não se tenha observado correlação entre a faixa etária e algum fator de virulência em particular, a prevalência de fatores mostrou variação segundo a idade dos pacientes. Assim, apenas três marcadores, *fimH*, *irp* e *chuA*, foram prevalentes independente da idade. Entretanto, outros marcadores

foram diferencialmente prevalentes em função da idade; na faixa I, *kpsMT II* e *iucD*; na faixa II, *iucD*, e *traT*; e na faixa III, *kpsMT II* e *papC* (Tabela 2).

Em relação à distribuição das amostras por grupo filogenético, a maioria foi classificada como pertencente aos grupos B2 e D (35 %

e 30%, respectivamente), sendo o grupo A o menos frequente (16 %). Em relação às características do hospedeiro, no sexo feminino, as amostras dos grupos B2 e D (77 %) foram significativamente mais prevalentes do que as amostras dos grupos A e B1 (23 %). O mesmo não ocorreu entre as amos-

Figura 2. Imagem ilustrativa da leitura dos resultados provenientes da hibridação de colônias
 A) Molde de semeadura das amostras. B) Resultados após exposição dos filtros hibridados a filme de raios X.
 A região velada do filme denota a presença de homologia entre o DNA da amostra pesquisada e a sequência utilizada como sonda

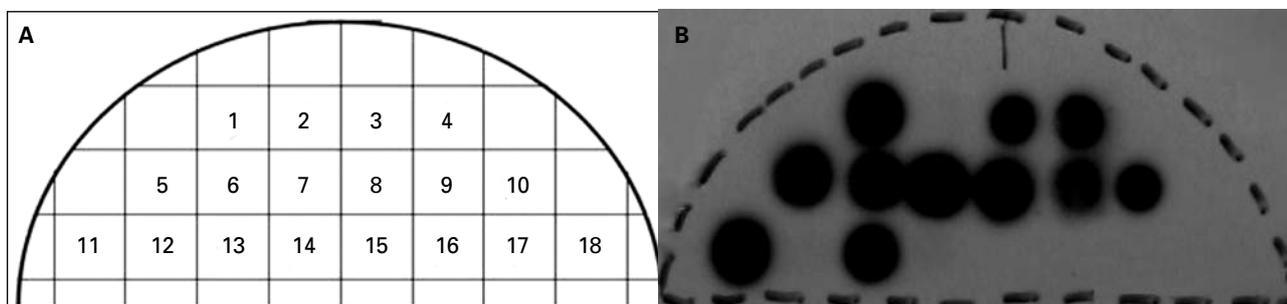


Tabela 2 . Distribuição dos fatores de virulência de ExPEC de acordo com as características dos hospedeiros [nº (%)]

Fatores de virulência	TOTAL n = 74	Faixa etária			Sexo	
		I	II	III	Feminino	Masculino
		n = 21	n = 27	n = 26	n = 31	n = 43
<i>fimH</i>	69 (93)	20 (95)	26 (96)	23 (88)	30 (97)	39 (91)
<i>irp2</i>	56 (76)	16 (76)	21 (77)	19 (73)	26 (84)	30 (70)
<i>chuA</i>	48 (65)	14 (67)	16 (59)	18 (69)	24 (77)	24 (56)
<i>kpsMT II</i>	48 (65)	14 (67)	16 (59)	18 (69)	23 (74)	25 (58)
<i>iucD</i>	47 (64)	14 (67)	19 (70)	14 (54)	24 (77)*	23 (53)
<i>traT</i>	45 (61)	12 (57)	20 (70)	14 (54)	19 (61)	26 (60)
<i>papC</i>	39 (53)	10 (48)	13 (48)	16 (62)	21 (68)*	18 (42)
<i>iha</i>	33 (45)	9 (43)	15 (56)	9 (35)	19 (61)*	14 (33)
<i>hlyA</i>	19 (26)	6 (29)	6 (22)	7 (27)	12 (39)*	7 (16)
<i>cvaC</i>	16 (22)	4 (19)	8 (30)	4 (15)	6 (19)	10 (23)
<i>iss</i>	16 (22)	6 (29)	6 (22)	4 (15)	8 (26)	8 (19)
<i>ompT</i>	13 (18)	5 (24)	5 (18)	3 (12)	8 (26)	5 (12)
<i>sfaDE</i>	11 (15)	2 (10)	5 (18)	4 (15)	4 (13)	7 (16)
<i>cnf1</i>	9 (12)	1 (5)	3 (11)	5 (19)	3 (10)	6 (14)
<i>afaBC III</i>	8 (11)	3 (14)	3 (11)	2 (8)	5 (16)	3 (7)
<i>kpsMT III</i>	2 (3)	1 (5)	0 (0)	1 (4)	1 (3)	1 (2)
<i>ibe10</i>	1 (1)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)

* P < 0,05

tras isoladas de pacientes do sexo masculino (Figura 3A). Quando a análise foi realizada utilizando-se como parâmetro a idade dos pacientes, observou-se apenas que as amostras do grupo D foram mais frequentes do que as amostras do grupo A ($P = 0,02$) na faixa etária III (Figura 3B).

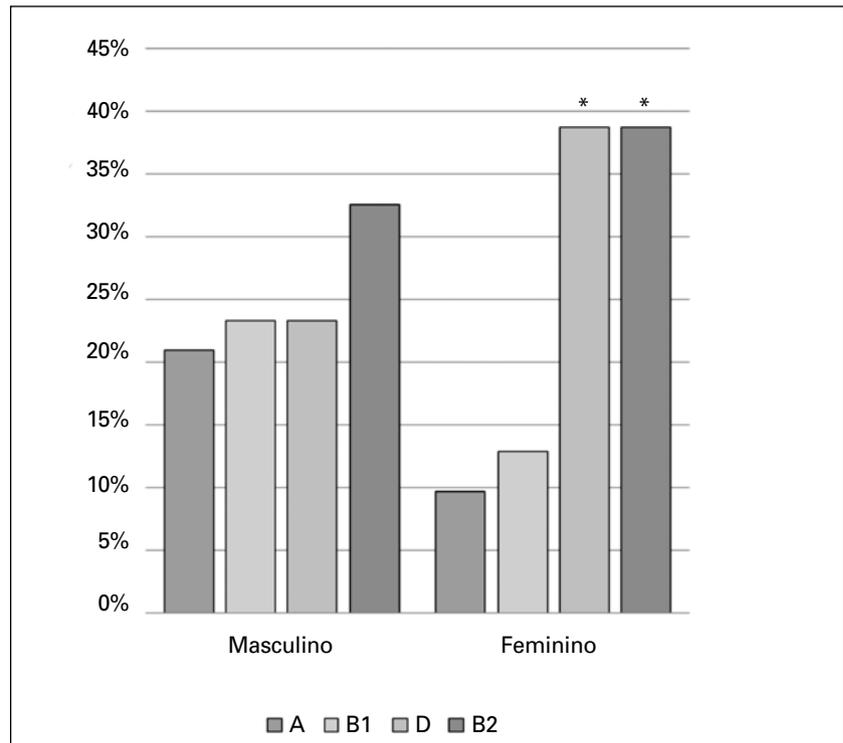
A análise realizada tomando-se em conta os três parâmetros, sexo, idade e filogenia, mostrou que a prevalência dos grupos filogenéticos nas diversas faixas, foi relativamente distinta, embora nem sempre apresentasse relação estatística (Figura 4). Nota-se diferenças de grupos filogenéticos das amostras isoladas de pacientes, dependendo do sexo, nas faixas etárias I e III. Ainda, na faixa III, a presença de amostras do grupo D foi associada ao sexo feminino, enquanto a presença de amostras do grupo B1 ao sexo masculino ($P \leq 0,04$).

Discussão e conclusões

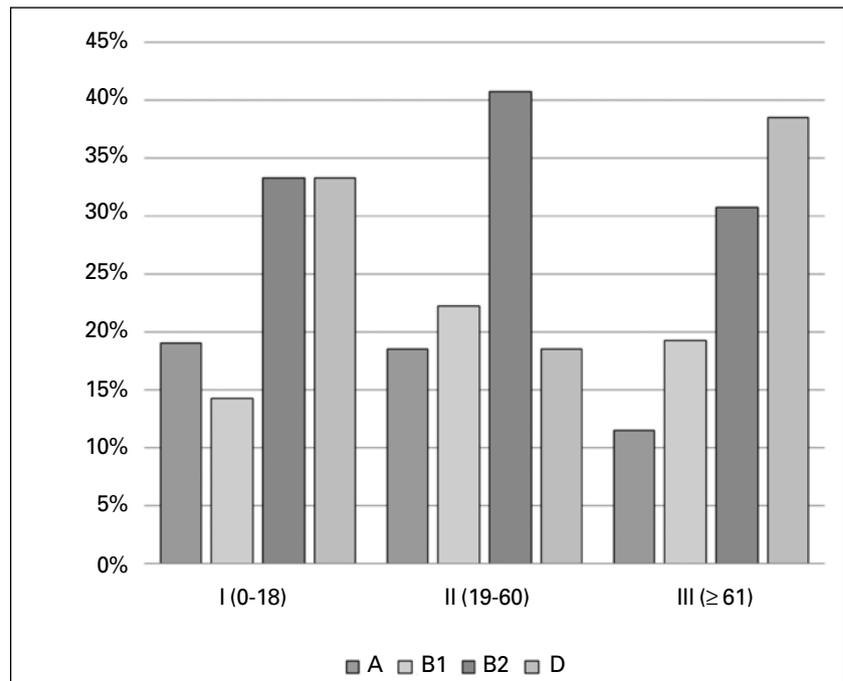
Os fatores de virulência mais prevalentes nas amostras de bacteremia humana estudadas neste trabalho foram, em geral, os mesmos já identificados por outros autores em outras áreas geográficas^{1,10,19,25}, ou seja *fimH* (Fímbria tipo 1) foi o fator mais frequente entre as amostras de ExPEC, seguido pela alta prevalência de *irp2* (yersiniabactina) e *kpsMT II* (cápsula do grupo II). Porém, houve diversidade com relação à prevalência dos grupos filogenéticos. Enquanto a literatura reporta predomínio das amostras do grupo B2 (65%) e baixa representatividade dos grupos D (20%) e A+B1, (15%)^{6,15,19}; neste trabalho encontrou-se frequência comparativamente mais baixa do grupo B2 (35%), e mais alta dos grupos D (30%) e A+B1 (35%). Uma hipótese para esta discrepância seria a presença de grande número de indivíduos com imuno-

Figura 3. Distribuição dos grupos filogenéticos de acordo com as características do hospedeiro. A) Houve prevalência dos grupos D e B2 apenas nos pacientes do sexo feminino (* $P < 0,05$). B) Não foi observada prevalência estatisticamente significativa de nenhum grupo filogenético quando a análise foi feita por faixa etária

A) Grupos Filogenéticos x Sexo



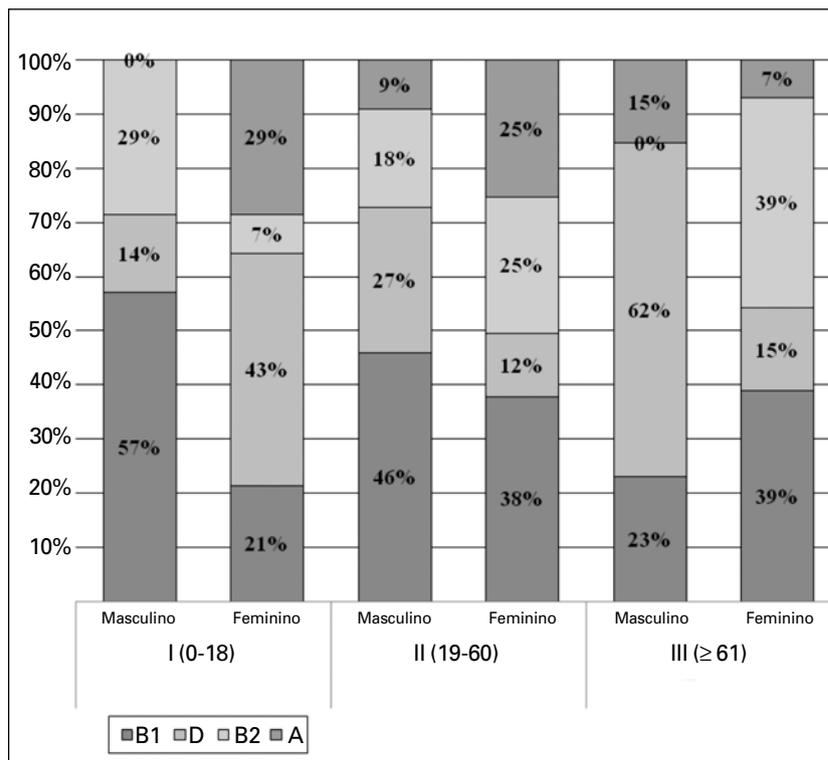
B) Grupos Filogenéticos x Faixa etária



comprometimento acentuado em função de sua doença de base – por exemplo, há muitos pacientes portadores de câncer na amostragem – propiciando a ocorrência de infecção por amostras de baixa virulência, ou comensais, dos grupos A e B1¹³. Entretanto, esta hipótese não se sustenta, pois muitas das amostras pertencentes ao grupo A apresentavam grande número de marcadores de virulência (dados não mostrados) qualificando-as como não comensais. Outra hipótese seria a presença dos grupos B2 e D terem alta representatividade entre as amostras da microbiota intestinal da população estudada. Diversos trabalhos têm avaliado a origem filogenética de amostras comensais e alguns deles têm demonstrado a ocorrência de diversidade de grupos filogenéticos dependendo da origem geográfica (países, cidades)^{4,8,29}. Contudo, não há dados a respeito da origem filogenética de amostras comensais isoladas de habitantes da cidade de São Paulo, origem das amostras deste estudo, o que deixa a questão da prevalência dos grupos filogenéticos aqui encontrados em aberto.

Diversos trabalhos têm relatado a importância de características do hospedeiro no desenvolvimento das infecções e até mesmo na seleção de amostras que irão compor a sua microbiota em relações de comensalismo^{5,8,21}. Admite-se que tanto indivíduos na infância (até cerca de oito anos de idade) como em idade avançada (acima dos 60 anos) têm um *déficit* imunológico intrínseco da idade; sendo os mais jovens, por uma imaturidade do sistema imune, e os mais velhos, pelo desgaste dos sistemas como um todo, além de uma maior associação com doenças de base^{7,18}. Neste trabalho foram avaliados parâmetros como sexo e idade do hospedeiro em relação às características de virulência e filogenia de amostras

Figura 4. Prevalência dos grupos filogenéticos nas faixas etárias segundo o sexo do hospedeiro. A distribuição dos grupos filogenéticos segundo o sexo e faixa etária dos pacientes revelou que apenas na faixa dos mais idosos (faixa III) houve diferenças estatisticamente significantes, sendo o grupo D mais frequente em mulheres e o grupo B1 mais frequente em homens (* $P < 0,05$)



isoladas de infecções. Quando as amostras foram comparadas de acordo com a faixa etária do hospedeiro, não houve diferenças nem no número de fatores de virulência encontrados por amostra (dados não mostrados) nem diferenças significantes na prevalência dos fatores. De certa forma, esses achados foram surpreendentes, pois em função do exposto acima, era razoável que ocorressem amostras com um número maior de fatores de virulência em pacientes da faixa etária II em comparação com os isolados dos pacientes das faixas I e III. Vale ressaltar que dentro da faixa I não houve qualquer diferença entre as amostras isoladas dos pacientes com até oito anos e os pacientes acima dos oito anos (dados não mostrados), sugerindo que a maturidade

imunológica não deve ser fundamental na seleção das amostras que irão infectar aquele hospedeiro.

Ao contrário do parâmetro idade, o parâmetro sexo parece influenciar na seleção das amostras que serão capazes de promover infecção. Assim, as amostras isoladas de pacientes do sexo feminino apresentaram maior número de fatores por amostra do que as isoladas de pacientes do sexo masculino. Além disso, a presença de amostras contendo os marcadores *iucD*, *papC*, *iha* e *hlyA* e pertencentes aos grupos considerados mais virulentos, B2 e D, foram estatisticamente relacionadas com pacientes do sexo feminino. Esses achados sugerem que amostras de *E. coli* causadoras de bacteremia em mulheres, precisam possuir um potencial de

virulência maior do que aquele apresentado por amostras causadoras de bacteremia em homens. É possível que este fato encontre uma explicação plausível na diferença de anatomia da região peri-anal de homens e mulheres. Na mulher, a proximidade das regiões anal e genit urinária propicia um acesso fácil de enterobactérias a sítios extra-intestinais, pela via urinária. Aliás, já foi descrito na literatura que essa proximidade seria responsável pela alta incidência de infecções urinárias nas mulheres²⁸. Apesar

desto, as mulheres não vivem em estado de infecção constante. Pode-se presumir que a ocorrência de infecções sub-clínicas, ao longo da vida da mulher, promova o aparecimento de anticorpos que poderão conferir uma proteção. Dessa forma, somente amostras com maior potencial de virulência, como as detectadas nas pacientes do sexo feminino neste trabalho, poderiam ser capazes de causar infecções. Em resumo, os dados aqui apresentados sugerem que o sexo do hospedeiro desempenha um

papel na seleção das características dos patógenos, enquanto a idade parece não influenciar de modo efetivo nesta seleção.

Agradecimentos

Às Dras. Tânia A. T. Gomes e Mônica A. M. Vieira, pelo auxílio em diversos experimentos de PCR e hibridação.

Este trabalho teve o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Ananias M & Yano T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(10):877-83.
2. Biendenbach DJ, Moet GJ, Jones, RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection from SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2002). *Diag Microbiol Infect Dis.* 2004;50:59-69.
3. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4555-8.
4. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventre A, Elion J, Picard B, Denamur E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol.* 2001;147:1671-6.
5. Escobar-Páramo P, Le Menach A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Skurnik D, Denamur E. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol.* 2006;8(11):1975-84.
6. Ewers C, Li G, Wilking H, Kiebling S, Alt K, Antão EM, Laturnus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Böhnke U, Steinrück H, Philipp HC, Wieler LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Inter J Med Microbiol.* 2007;297(3):163-76.
7. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine.* 2000;18:1717-20.
8. Gordon DM, Stern SE, Collignon PJ. Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiol.* 2005;151:15-23.
9. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1990;172:6175-81.
10. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 2000;181:261-72.
11. Johnson JR, Stell AL, Delavari P, Murray AC, Kuskowski MA, Gaastra W. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infection in humans. *J Infect Dis.* 2001;183:897-906.
12. Johnson JR, Weissman SJ, Stell AL, Trintchina E, Dykhuizen DE, Sokurenko EV. Clonal and pathotypic analysis of archetypal *Escherichia coli* cystitis isolate NU14. *J Infect Dis.* 2001;184:1556-65.
13. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J Lab Clin Med.* 2002;139(3):155-62.
14. Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Inter J Med Microb.* 2005;295:383-404.
15. Johnson JR, Kuskowski MA, Gejewski A, Soto S, Horcajada JP, Anta MTJ, Vila J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis.* 2005;191:46-50.
16. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:123-40.

17. Langsrud O. Fisher exact test [acessado 01 Out 2007]. Disponível em: <http://www.langsrud.com/fisher.htm>
18. Miyake MAM, Menon AD. Roteiro diagnóstico da tosse na infância [acessado 03 Nov 2009]. Disponível em: http://www.ciber-saude.com.br/revistas.asp?id_materia=1303&fase=imprime
19. 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 source of bacteremia. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2005;53:93-9.
20. Moulin-Schouler M, Reperant M, Laurent S, Bree A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and Human origin: link between phylogenetic relationship and common virulence patterns. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3366-3376.
21. Rendon MA, Saldana Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vazquez A, Kaper JB, Puente JL, Giron JA. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *PNAS.* 2007;104(25):10637-42.
22. Russo TA, Johnson JR. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2000;181:1753-4.
23. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis.* 2001;5(4):200-14.
24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2a ed. New York: CSH; 1989.
25. Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis.* 2004;190:2121-8.
26. Scaletsky ICA, Fabbicotti SH, Aranda KR, Morais MB, Fagundes-Neto U. Comparison of DNA Hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1254-8.
27. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmor MN, Whittam TS. Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51:873-84.
28. Xie J, Foxman B, Zhang L, Marrs CF. Molecular epidemiologic identification of *Escherichia coli* genes that are potentially involved in movement of the organism from the intestinal tract to vagina and bladder. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2434-41.
29. Zhang L, Foxman B, Marrs C. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):3951-5.

Recebido em 14 de agosto de 2009
Aprovado em 9 de setembro de 2009