

## Fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* septicêmicas

### Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains

Geizecler Tomazetto; Amália C.M. Silva; Marilda Carlos Vidotto  
Universidade Estadual de Londrina, Depto. de Microbiologia,  
Campus Universitário, Caixa postal 6001, 86051-970, Londrina- PR

---

#### Resumo

Amostras de *Escherichia coli* que causam infecções extraintestinais como meningite, septicemia e infecção do trato urinário apresentam vários fatores de virulência, diferente da *E. coli* não patogênicas. Com o objetivo de detectar características de virulência, amostras de *E. coli* septicêmicas isoladas de hemocultura de pacientes hospitalizados foram analisadas quanto à resistência a drogas e fatores de virulência como: produção de sideróforos, hemolisina, colicinas, resistência sérica e capacidade de invasão em células HEp2. Das 20 amostras analisadas, todas apresentaram resistência múltipla a drogas antimicrobianas e resistência sérica, 5 (25%) apresentaram hemolisina, 3 (15%) produziram colicina, 9 (45%) produziram o sideróforo aerobactina e 8 (40%) expressam o receptor da aerobactina apresentando sensibilidade a cloacina. As *E. coli* estudadas invadiram células HEp-2 sugerindo a importância das características invasivas na septicemia. A patogenicidade das amostras de *E. coli* septicêmicas se deve a características multifatoriais como invasão, resistência sérica e produção de sideróforo, semelhantes às encontradas em outras infecções extraintestinais.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli* septicêmica, fatores de virulência, aerobactina, resistência sérica, invasão.

#### Abstract

Extraintestinal pathogenic *E. coli* strains (ExPEC) cause a diverse spectrum of diseases, including urinary tract infections, newborn meningitis, abdominal sepsis and septicemia. These strains present various virulence factors in contrast to non pathogenic *E. coli* strains. The objective of this work was detect characteristics of virulence in septicemic *E. coli* isolated from blood of hospitalized patient, which were analyzed to drugs resistance and virulence

factors as siderophore, hemolysin and colicin production, serum resistance and capacity to invade HEp2 cells. Of 20 strains analyzed, all presented multiple drug resistance and serum resistance; 5 (25%) presented hemolysin, 3 (15%) produced colicin, 9 (45%) produced the siderophore aerobactin and 8 (40%) expressed the aerobactin receptor, presenting sensibility to cloacin. The studied strains invaded HEp2 cells, suggesting the importance of invasive characteristics in the septicemia. The pathogenicity of septicemic *E. coli* strains is due multiple characteristics as invasion, serum resistance and siderophore production, similar to others extraintestinal infections.

**Key words:** Extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC, aerobactin, serum resistance, invasion.

---

## INTRODUÇÃO

Além das diferentes categorias de *Escherichia coli* que causam infecções intestinais, existem amostras “extraintestinal pathogenic *E. coli*” (ExPEC) que causam infecções como meningite em neonatos, infecções de trato urinário e septicemia <sup>(1, 2)</sup>. A septicemia em humano é usualmente secundária a infecções de trato urinário e do trato respiratório. A maioria das ExPEC são oportunistas e o sitio de infecção não é necessariamente o sítio de colonização. Estas amostras freqüentemente produzem adesinas, mas o papel da adesão inicial na especificidade do hospedeiro e na patogênese não está claro, em contraste com as amostras intestinais <sup>(1)</sup>.

As amostras ExPEC constituem um problema para a medicina, especialmente em pacientes imunocomprometidos por causa da doença, quimioterapia ou idade. A incidência de infecção septicêmica tem aumentado e é maior em homens que em mulheres devido o aumento de septicemia por infecções de trato urinário e pulmão; doenças crônicas como diabetes e câncer <sup>(3)</sup>. ExPEC tem alta incidência de resistência as drogas antimicrobianas, freqüentemente transmissíveis por plasmídios <sup>(4)</sup>.

Os fatores de virulência que tem sido encontrado em ExPEC são: produção de sideróforos para a captação de íons ferro, toxinas, hemolisina, adesinas fímbrias e afimbriais, resistência sérica e capacidade de invadir células endoteliais <sup>(5, 6)</sup>.

As *E. coli* de infecção urinária e septicêmica possuem 2 tipos de sideróforos aerobactina e/ou yersiniobactina que conferem a essas bactérias eficiência maior na captação do íon ferro quando está presente em baixas concentrações <sup>(6)</sup>. Para aderir e invadir as células do hospedeiro, as amostras patogênicas também têm desenvolvido uma variedade de fímbrias como fímbrias P, S e tipo 1C <sup>(6, 7, 8)</sup>.

O objetivo deste estudo foi verificar a presença de fatores de virulência em amostras de *E. coli*, isoladas de hemocultura humana.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Amostras bacterianas*

Foram analisadas vinte amostras de *Escherichia coli* isoladas de hemocultura humana. As amostras foram cedidas pelo Setor de microbiologia do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná – Londrina. Essas amostras foram isoladas de recém-nascidos, crianças e adultos.

As amostras foram semeadas em caldo de soja triptcaseína e após a incubação a 37° C por 18 h foi adicionada glicerina a 15% para a estocagem a – 20° C.

### *Produção de Hemolisina*

A determinação qualitativa da produção de hemolisina foi realizada com placas de ágar sangue de carneiro e humano a 5%. As amostras eram inoculadas nessas placas, em seguida, incubadas por 18 h a 37° C. A presença de halos de hemólise

ao redor das colônias indicava a produção de hemolisina. Como controle negativo foi utilizada *E. coli* K12-711 F.

#### *Produção do sideróforo aerobactina*

As amostras foram crescidas em meio mínimo M9 contendo 0,2 mM de 2-2 biperidina, por 18 h a 37 °C e em seguida foram transferidas, com auxílio de palitos estéreis, para placas de M9 + biperidina contendo a indicadora *E. coli* LG 1522, mutante nos genes da síntese do sideróforo aerobactina, previamente inoculada por *pour-plate*<sup>(9)</sup>. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h e a produção de aerobactina era detectada pela presença de halo de crescimento da amostra *E. coli* LG 1522 ao redor dos inóculos. Como controle positivo e negativo foram utilizadas as amostras LG 1315 e HB101. As amostras padrão *E. coli* LG 1522 e LG1315 foram gentilmente cedidas por Dr. Peter H. William, Leicester, England.

#### *Deteção da expressão do receptor da aerobactina*

Para detectar a expressão do receptor da aerobactina foi utilizado o teste de sensibilidade à cloacina<sup>(10)</sup>. A cloacina foi extraída das amostras *E. coli* F205. As amostras a serem testadas foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo biperidina por 18h a 37 °C. Em seguida, 100 µl da amostra eram inoculados pela técnica de "*pour plate*" em placas contendo M9 + biperidina homogeneizados em 5 ml de ágar 2%. No centro das placas foram adicionados 20 µl da cloacina após a solidificação do ágar. Após a incubação por 18h a 37° C foram consideradas positivas as amostras que apresentam um halo de inibição ao redor do inóculo da cloacina. As amostras de *E. coli* LG 1315 e HB 101 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

### *Produção de colicina*

As mostras cultivadas em caldo LB por 18 h a 37° C foram transferidas com o auxílio de palitos estéreis para placas de LB ágar que foram incubadas a 37° C por 18h. Após esse período as placas foram submetidas a vapores de clorofórmio por 15 minutos e colocadas a 37° C por 30 minutos para a evaporação do clorofórmio. Em seguida, sobre o ágar com as bactérias lisadas pelo clorofórmio, foram inoculados 3 ml de LB semi-sólido, fundido a 50 °C, contendo a amostra indicadora *E. coli* MA 335. As placas foram incubadas a 37° C por 18h e a determinação de produção de colicina era detectada pela presença do halo de inibição de crescimento da cepa indicadora ao redor da amostra em estudo.

### *Resistência sérica*

A determinação da resistência sérica foi realizada pela técnica de Pelkonen & Fine (1987) <sup>(11)</sup>. O soro obtido de voluntários sadios foi estocado em alíquotas de 1 ml e mantido a – 20 °C até o momento do uso. As *E. coli* cultivadas por 18 h em caldo LB foram diluídas 1:100 novo caldo LB e incubadas a 37 °C até atingirem a fase exponencial. As culturas foram centrifugadas a 8.000 x g , os sedimentos ressuspensos em PBS pH 7,4 e distribuídos em microplacas de 96 cavidades juntamente com o soro humano, para uma concentração final de 50%. As placas foram incubadas a 37 °C por 0,30, 60, 90, 120. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de Elisa com filtro 650 nm. As amostras consideradas sensíveis ou resistentes ao soro por comparação com a DO obtida no tempo zero. A amostra UEL 9 foi utilizada como padrão resistente e *E. coli* K12 711 como sensível ao soro.

### *Teste de invasão em cultura de células HEp-2*

A capacidade de a bactéria invadir células HEp-2 foi realizada como descrito previamente por Robins-Browne &

Bennett-Wood (1992) <sup>(12)</sup> com modificações. As células HEp-2 foram crescidas em microplacas contendo lamínulas em meio Dulbecco acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37° C.

As amostras a serem testadas e os controles positivo (EIEC O144:H<sup>-</sup>) e negativo (HB101) foram crescidos em LB caldo a 37° C por 18 h, após esse período 40 µl da amostra foram diluídos em 1 ml de meio Dulbecco e incubados durante 2 h a 37° C.

As microplacas contendo as células HEp-2 foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7,4, e em seguida, foram adicionado 0,5 ml de meio Dulbecco, suplementado com D-manose (2%) e SFB (4%), e 0,5 ml da cultura bacteriana em meio Dulbecco (10<sup>6</sup> bactérias), e a placa incubada a 37° C durante 1 h e 30 minutos (período de infecção). Após esse período o meio foi removido e as lamínulas lavadas 5 vezes com PBS. Em seguida, foi adicionado 1 ml de meio Dulbecco suplementado com D-manose (2%), SFB (4%) e gentamicina (100 µg/ml) para eliminar as bactérias que não invadiram as células e novamente incubadas a 37°C por 1 h e 30 minutos (período de multiplicação intracelular). O meio de cultura foi então removido, as lamínulas fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com May-Grünwald-Giemsa. As lamínulas coradas foram montadas com bálsamo do Canadá sobre lâminas para análise em microscópio óptico com objetiva de imersão.

Para o teste de invasão quantitativo em células HEp-2, as suspensões de células, aproximadamente 10<sup>6</sup> bactérias foram transferidas para tubos Leighton sem lamínulas, e mantidas sob as mesmas condições. O teste foi realizado em duplicata para cada amostra. A monocamada de células HEp-2 formada nos tubos Leighton foi lavada 3 vezes com PBS e em cada tubo era adicionado 0,5 ml de meio Dulbecco, suplementado com D-manose (2%) e SFB (4%), e 0,5 ml de cultura bacteriana cultivada em meio Dulbecco. Após a incubação a 37° C durante

1 h e 30 minutos (período de infecção), a monocamada celular foi lavada 5 vezes com PBS eliminando as bactérias não aderidas as células. Em seguida, os tubos foram novamente incubados por 1 h e 30 minutos (período de multiplicação intracelular) contendo 1 ml de meio Dulbecco suplementado com D-manose (2%), SFB (4%) e gentamicina (100 µl/ml) para eliminar as bactérias não invasoras aderidas. Após esse período 1 ml de Triton 1% em PBS foi adicionado aos tubos e após 10 minutos de incubação era realizada a contagem de UFC/ml da suspensão em ágar LB. O resultado era obtido dividindo o número de UFC que resistiram ao tratamento com gentamicina pelo número de UFC do inóculo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A septicemia está associada a infecções do trato urinário e do pulmão, a doenças crônicas como diabetes e câncer; e os agentes causais mais freqüentes são *E. coli* e *Staphylococcus sp* (3). Neste estudo, analisamos 20 isolados de *E. coli* de hemocultura humana quanto aos fatores de virulência e resistência as drogas antimicrobianas.

Todas as amostras de *E. coli* estudadas apresentaram resistência múltipla a drogas antimicrobianas (Tabela 1) e resistência ao soro. Das 20 amostras analisadas, 5 (25%) apresentaram halo de hemólise em ágar sangue de humano e carneiro, 3 (15%) produziram a colicina, 9 (45%) produziram o sideróforo aerobactina e 8 (40%) expressam o receptor da aerobactina apresentando um halo de sensibilidade ao redor da cloacina (Tabela 2). Estes fatores apresentam correlação com a colonização e invasão da ExPEC no tecido e sua multiplicação no hospedeiro (6).

**Tabela 1.** Níveis e perfil de resistência a drogas Antimicrobianas de *E. coli* isoladas de hemocultura humana.

<b>Amostras</b>	<b>Ap</b>	<b>Cb</b>	<b>Cf</b>	<b>Cm</b>	<b>Sm</b>	<b>Fo</b>	<b>Gn</b>	<b>Kn</b>	<b>Si</b>	<b>Su</b>	<b>Tb</b>	<b>Tc</b>	<b>Tr</b>	<b>Perfil de Resistência</b>
1	>1000	>1000	50	100	-	-	-	500	-	-	-	-	>1000	ApCbCfCmKnTr
2	>1000	>1000	-	-	100	250	-	500	-	-	-	-	>1000	ApCbSmFoKnTr
3	>1000	>1000	100	200	100	500	>1000	>1000	200	>1000	>1000	100	>1000	ApCbCfCmSmFoGnKnSiSuTbTcTr
4	50	-	50	-	-	250	-	-	-	-	-	100	>1000	ApCfFoTcTr
5	>1000	>1000	50	100	200	50	500	500	-	>1000	-	100	500	ApCbCfCmSmFoGnKnSuTcTr
6	>1000	>1000	100	100	100	200	-	>1000	100	-	-	100	500	ApCbCfCmSmFoKnSiTcTr
7	>1000	>1000	-	-	200	200	-	-	-	>1000	-	-	-	ApCbSmFoSu
8	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	ApFo
9	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	500	-	-	ApFoSu
10	100	-	-	200	-	50	-	-	-	-	-	50	-	ApCmFoTc
11	>1000	>1000	-	150	200	50	-	-	-	-	-	-	-	ApCbCmSmFo
12	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ap
13	>1000	>1000	100	-	250	50	>1000	500	-	>1000	-	200	500	ApCbCfSmFoGnKnSuTcTr
14	500	>1000	-	-	150	-	-	-	-	-	-	-	-	ApCbSm
15	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ap
16	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ap
17	100	-	100	200	30	-	-	>1000	-	-	-	100	500	ApCfCmSmKnTcTr
18	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ap
19	>1000	>1000	-	100	200	-	-	>1000	-	>1000	-	100	>1000	ApCbCmSmKnSuTcTr
20	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ap

Ap- Ampicilina; Cb- Carbecilina; Cf- Cefalotina; Cm- Cloranfenicol; Sm- estreptomomicina; Fo- Fosfomicina; Gn - Gentamicina; Kn- canamicina; Si- Sisomicina; Su- Sulfanamida; Tb- Tobramicina; Tc -Tetraciclina; Tr-Trimetropin.

**Tabela 2.** Características Fenotípicas de *E. coli* isoladas de hemocultura humana

Amostras	Hemolisina	Receptor do Sideróforo	Produção de Aerobactina	Colicina	Resistência sérica
1	+	+	+	-	+
2	-	-	+	-	+
3	+	+	+	-	+
4	-	+	+	-	+
5	-	-	-	+	+
6	-	+	+	-	+
7	-	+	+	-	+
8	-	-	-	-	+
9	+	-	-	-	+
10	+	-	-	-	+
11	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	+
13	+	+	+	-	+
14	-	-	-	+	+
15	-	+	+	+	+
16	-	-	-	-	+
17	-	+	+	-	+
18	-	-	-	-	+
19	-	-	-	-	+
20	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> 711	-	-	-	-	-

ND = sorogrupo não determinado com os anti-soros utilizados

O sistema aerobactina utilizado por algumas cepas de *E. coli* é um importante fator de virulência uma vez que essa bactéria usa esse mecanismo para crescer em meio pobre de íon ferro (6). O receptor de membrana para aerobactina (*iutA*) é comumente associado a infecção extraintestinal e isolados de bacteremia <sup>(13)</sup>.

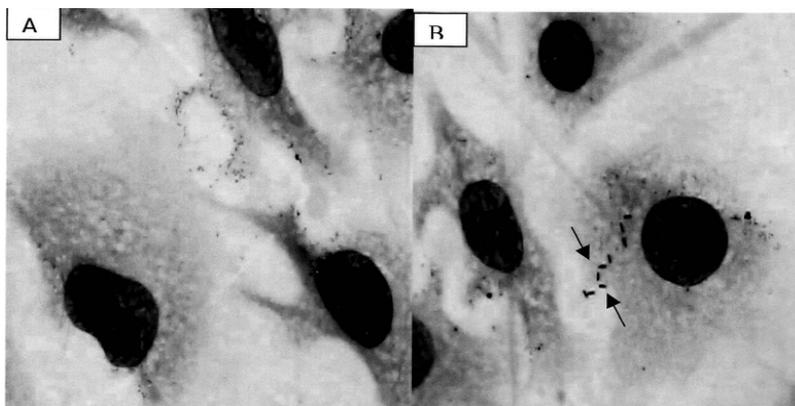
A resistência ao soro presente em ExPEC é mediada por várias características de virulência como lipopolissacarídeos, cápsula e proteínas de membrana <sup>(14, 15)</sup>. O antígeno K1 contribui para o alto nível de bacteremia devido à resistência sérica e propriedade antifagocítica, e está associado à meningite em neonatos <sup>(16)</sup>.

A detecção de colicinas nas amostras estudadas sugere a presença de plasmídeo Col V, o qual geralmente codifica as proteínas de membrana TraT e Iss envolvidas na resistência

sérica <sup>(17)</sup>. A produção de hemolisina também está associada a amostras ExPEC <sup>(13)</sup> e foi detectada em 25% das amostras estudadas.

A invasão em células epiteliais eucarióticas é outro importante fator de virulência de *E. coli* patogênicas envolvidas em infecções extraintestinais <sup>(18, 19)</sup>. Neste trabalho, o teste de invasão quantitativo detectou 19 (95%) amostras com capacidade de invadir as células HEp2 e a percentagem de invasão variou de 0,014% a 9,6% (Tabela 3). A Figura 1 mostra a invasão da ExPEC 9 na célula HEp2, sugerindo a importância das características invasivas na septicemia. Amostras de *E. coli* meningovirulentas são capazes de invadir as células endoteliais cerebrais através da invasina Ibe e fator citotóxico necrozante <sup>(19, 20)</sup>.

A patogenicidade das amostras de *E. coli* isoladas de hemocultura se deve a características multifatoriais como invasão, resistência sérica e produção de sideróforos, semelhantes às encontradas em outras infecções extraintestinais.



**Figura 1.** Invasão em células HEp-2. A- *E. coli* HB101. B- ExPEC 9.

**Tabela 3.** Teste de Invasão em células HEP-2

Amostras	Invasão Qualitativa	Invasão Quantitativa (UFC/ml) <sup>a</sup>	% Invasão <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> 1	+	9,6 x 10 <sup>2</sup>	9,6
<i>E. coli</i> 2	+	1,2 x 10 <sup>4</sup>	1,2
<i>E. coli</i> 3	+	5,2 x 10 <sup>4</sup>	5,2
<i>E. coli</i> 4	+	2,3 x 10 <sup>3</sup>	0,23
<i>E. coli</i> 5	+	8,9 x 10 <sup>3</sup>	0,89
<i>E. coli</i> 6	+	2,8 x 10 <sup>3</sup>	0,28
<i>E. coli</i> 7	-	0	0
<i>E. coli</i> 8	-	2,3 x 10 <sup>3</sup>	0,23
<i>E. coli</i> 9	-	3,2 x 10 <sup>3</sup>	0,32
<i>E. coli</i> 10	-	4,1 x 10 <sup>3</sup>	0,41
<i>E. coli</i> 11	+	2,3 x 10 <sup>2</sup>	0,023
<i>E. coli</i> 12	+	1,3 x 10 <sup>3</sup>	0,13
<i>E. coli</i> 13	-	6,2 x 10 <sup>2</sup>	0,062
<i>E. coli</i> 14	-	2 x 10 <sup>2</sup>	0,02
<i>E. coli</i> 15	+	2,3 x 10 <sup>2</sup>	0,023
<i>E. coli</i> 16	+	6,2 x 10 <sup>4</sup>	6,2
<i>E. coli</i> 17	-	1,4 x 10 <sup>2</sup>	0,014
<i>E. coli</i> 18	+	1,2 x 10 <sup>3</sup>	0,12
<i>E. coli</i> 19	+	3,2 x 10 <sup>4</sup>	3,2
<i>E. coli</i> 20	-	3 x 10 <sup>2</sup>	0,032
EIEC O144: H <sup>-</sup>	-	3,53 x10 <sup>4</sup>	3,53
<i>E. coli</i> HB 101	-	0	0

<sup>a</sup> UFC/ml – Unidade formadora de colônias por mililitro

<sup>b</sup> Porcentagem de Invasão (UFC sobrevivente a gentamicina/UFC do inoculo) x 100%

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*" J.Lab.Clin Med. 139:155-162, 2002.
2. Kim K.S. Strategy of *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. Infect. Immun.69: 5217-5222, 2001.
3. McBean M, Rajamani, S. Increasing Rates of Hospitalization Due to Septicemia in the US Elderly population, 1986-1997. J. Infect Diseases. 183: 596-603, 2001.

4. Johnson JR, Kuskowski MA, Gjewski A, Sahm DF, Karlowsky JA: Virulence Characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States. *J. Infect. Diseases* 190:1739-1744, 2004.
5. Russo TA, Johnson JR. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*:ExPEC. *J. Infect. Diseases* 181: 1753-1754, 2000.
6. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4(1): 80-128, 1991.
7. Prasadarao NV, Wass CA, Hacker J, Jann K, Kim KS. Adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to Brain Glycolipids Mediated by *sfaA* gene-encoded Protein of S-fimbriae. *J. Biological Chemistry* 268: 10356-63,1993.
8. Siitonen A, Takala A, Ratiner YA, Pere A, Makela PH. Invasive *Escherichia coli* infections in children: bacterial characteristics in different age groups and clinical entities. *Pediatr Infect. Dis. J.* 12: 606-612, 1993.
9. Vidotto MC, Muller EE, Freitas JC, Alfieri AA, Guimarães IG, Santos DS. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 34: 531-538, 1990.
10. Graaf FK, Tieze GA, Wendelaar S. et al. Purification and Genetic Determination of bacteriocin Production in *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* 95: 631-40, 1968.
11. Pelkonen, Finne, J. A rapid turbidimetric assay for the study of serum sensitivity of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters* 42: 53-57, 1987.
12. Robins-Browne RM, Bennett-Wood V. Quantitative assessment of the ability of *Escherichia coli* to invade cultured animal cells. *Microbial Pathogenesis* 12: 159-164,1992.
13. Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell A. Phylogenetic Distribution of extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Diseases* 183: 78-88, 2001.
14. Montenegro MA, Bitter-Suermannnd D, Timmis JK. et al. TraT gene sequences, Serum Resistance and Pathogenicity-related Factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and Other Gram-negative bacteria. *J. General Microbiol.* 131: 1511-21, 1985.

15. Johnson JR, Stell A. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J. Infect. Diseases.* 181: 261-72, 2000.
16. Hoffman JA, Badger JL, Zhang Y, Huang SH, Kim KS. *Escherichia coli* K1 *asfA* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Infect. and Immun.* 68: 5062-5067, 2000.
17. Binns MM, Davies DL, Hardy KG. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature* 279: 778-81, 1979.
18. Stins MF, Nemani PV, Wass C, Kim KS. *Escherichia coli* binding to and invasion of brain microvascular endothelial cells derived from humans and rats of different ages. *Infect. and Immun.* 67:5522-5525,1999.
19. Huang SH, Wass C, Fu Q, Prasadarao NV, Stins M, Kim KS. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. *Infect. and Immun.* 63: 4470-75, 1995.
20. Khan NA, Wang Y, Kim KJ. Cytotoxic Necrotizing Factor-1 Contributes to *Escherichia coli* K1 Invasion of the Central Nervous System. *J. Biological Chemistry.* 277: 15607-612, 2002.

