

RODRIGO ASSUNÇÃO MOURA

**“ESTUDO DAS RELAÇÕES CLONais ENTRE AMOSTRAS DE
ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA DE
ORIGEM ANIMAL E HUMANA”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro.

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili.

**São Paulo
2009**

RESUMO

MOURA, R. A. **Estudo das relações clonais entre amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica de origem humana e animal.** 2009. 152 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

EPEC atípica é um patógeno emergente em nosso país. Assim como as EPEC típicas possuem o gene *eae* e são capazes de produzir lesão *attaching and effacing*. A principal diferença entre estes patótipos reside no fato de cepas EPEC atípica não possuírem e/ou não expressarem os genes que codificam a fímbria *bundle forming pilus* (*Bfp*). No campo epidemiológico, a principal diferença se deve ao fato de amostras EPEC típica terem os seres humanos como principal reservatório, e as EPEC atípica serem isoladas de humanos e animais em freqüências equivalentes, não permitindo a definição de um reservatório. Até o momento, nenhuma pesquisa comparou de modo amplo as relações clonais entre amostras de EPEC atípica isoladas de animais e humanos. O objetivo deste estudo foi verificar se animais podem atuar como reservatórios e fonte de infecção de EPEC atípica para humanos. Para isto, 49 amostras de EPEC atípica e EPEC típica, de diferentes sorotipos, isoladas de humanos e animais (cães, gatos, bovinos, ovinos, coelhos e sagüis) foram estudadas quanto ao seu perfil genotípico pela PCR, e similaridade clonal por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Os marcadores de virulência analisados (*eae*, *tir*, *bfpA*, *stx1*, *stx2*, *stx2f*, *astA*, *E-hlyA*, *espA*, *espB*, *espD*, *espF*, *sepL*) revelaram que cepas de EPEC atípica isoladas de animais possuem potencial para causar diarréia em humanos. Além disso, a análise dos subtipos de *eae*, *tir* e genes *esp* revelaram que a ilha de patogênicidade *Locus of Enterocyte Effacement* pode ser adquirida a partir de uma única e/ou de diferentes origens. As técnicas MLST e PFGE revelaram que as amostras isoladas de animais e humanos compartilham relações clonais muito próximas, com algumas cepas apresentando perfis MLST e/ou PFGE idênticos. Foi observado, também que cepas de EPEC atípica, bem como outros patógenos de *E. coli* diarreogênica (ECD) podem ter se originado da perda e/ou ganho de genes *bfp* e *stx*.

Devido à proximidade clonal encontrada entre as amostras isoladas de animais e humanos podemos inferir que os animais estudados podem atuar como reservatório e fonte de infecção de EPEC atípica para humanos. Pelo fato de humanos possivelmente também atuarem como reservatório de EPEC atípica, ciclos de infecção cruzada entre animais, principalmente de estimação e humanos não podem ser descartados, uma vez que a dinâmica de transmissão entre reservatórios deste patógeno não é muito bem compreendida.

Palavras-Chave: EPEC atípica. EPEC típica. Diarréia. MLST. PFGE. Relação Clonal. Amostras Humanas. Amostras Animais. Reservatório Animal.

ABSTRACT

MOURA, R. A. **Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans.** 2009. 152 p. Thesis (PhD in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Atypical EPEC is an emergent pathogen in Brazil. Like typical EPEC, these bacteria posses *eae* gene and are capable to produce attaching and effacing lesions (A/E lesion). The main difference between these pathotypes is the absence of pEAF and/or no evidence of expression of bundle forming pilus (Bfp). Epidemiologically these pathotypes diverge from their reservoirs, while typical EPEC strains have humans as their major reservoir, atypical EPEC strains are isolated from both humans and different animal species. Because of its wide spread, it is difficult to determine reservoirs for atypical EPEC strains. Currently there is no research that compared the clonal relationship among atypical EPEC strains isolated from humans and different animal species. The aim of this study was to compare atypical EPEC strains isolated from humans and different animals, including pets, farm animals and wild animals by molecular phylogenetic techniques to verify the role of animals as reservoir and infection source of atypical EPEC for humans. Forty-nine typical and atypical EPEC strains belonging to different serotypes, isolated from humans, pets (cats and dogs), farm (bovines, sheep and rabbits) and wild animals (monkeys) were investigated for virulence markers and clonal similarity by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST). The virulence markers analyzed (*eae*, *tir*, *bfpA*, *stx1*, *stx2*, *stx2f*, *astA*, *E-hlyA*, *espA*, *espB*, *espD*, *espF*, and *sepL*) revealed that atypical EPEC strains isolated from animals have the potential to cause diarrhea in humans. Beside these data, the analysis of *eae*, *tir* and *esp* genes indicated that atypical EPEC strains can acquire the entire LEE region or just single genes of this region from different origins. Close clonal relationship between human and animal isolates was found with MLST and PFGE. These results indicate that these animals act as atypical EPEC reservoirs and may represent sources of infection for humans. Some atypical EPEC strains showed close relationship to typical EPEC strains or

STEC strains, based on these data some diarrheogenic *E. coli* may have evolved either by acquisition or loss of *stx* or *bfp* genes. Since humans also act as a reservoir of atypical EPEC strains, the cycle of mutual infection between animals and humans, mainly pets and their owners, cannot be ruled out, since the transmission dynamics between the reservoirs are not yet clearly understood.

Key Words: Atypical EPEC. Typical EPEC. Diarrhea. MLST. PFGE. Clonal Relationship. Human Strains. Animals Strains. Animal Reservoir.

1 INTRODUÇÃO

Cepas *Escherichia coli* colonizam o trato gastrointestinal de seres humanos e animais poucas horas após o nascimento, e constituem o principal membro anaeróbio facultativo da microbiota intestinal destes organismos (NATARO e KAPER, 1998; KAPER *et al.*, 2004). Esta espécie, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, raramente causa doença em seus hospedeiros, exceto em imunocomprometidos ou quando as barreiras gastrointestinais são rompidas, como nos casos de peritonite (DRASSAR e HILL, 1974; NATARO e KAPER, 1998).

Apesar de seu papel como comensal, algumas cepas *E. coli* são capazes de causar uma grande variedade de doenças, devido à aquisição de fatores de virulência por transferência horizontal (KAPER *et al.*, 2004). Dentre estas doenças, a diarréia é uma das principais, sendo as *E. coli* diarreogênicas (ECD) responsáveis por inúmeros surtos de diarréia registrados no mundo (VILJANEN *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 1996; TRABULSI *et al.*, 1996; HEDBERG *et al.*, 1997; MICHINO *et al.*, 1999; JENKINS *et al.*, 2003; YATSUYANAGI *et al.*, 2003; HUSSEIN e BOLLINGER, 2005).

Atualmente são conhecidos seis patótipos de ECD: *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteropatogênica (EPEC), subdividida em EPEC típica e EPEC atípica; *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* enteroaggregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998; KAPER *et al.*, 2004). Dentre estes patótipos, cepas EPEC destacam-se como um importante agente diarreogênico presente em países em desenvolvimento (OCHOA *et al.*, 2008).

1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Os primeiros surtos de diarréia causados por EPEC foram descritos por Bray (1945) no Reino Unido. Este pesquisador identificou grupos de *E. coli*, sorologicamente distintos, que eram isolados de crianças com diarréia, mas não de crianças sadias. Após este estudo, diversos surtos de diarréia, com altas taxas de mortalidade, foram descritos em países desenvolvidos até o final dos anos 50 (ROWE, 1979; LEVINE e EDELMAN, 1984). Devido aos freqüentes surtos de *E. coli* registrados naquela época, Neter *et al.* (1955) criaram o termo EPEC para definir as amostras *E. coli* que causavam estes surtos.

No final dos anos 50, por razões desconhecidas, grandes surtos de diarréia causados por EPEC deixaram de ocorrer em países desenvolvidos. Infecções causadas por este patógeno ficaram restritas a casos esporádicos em alas hospitalares, até o final da década de 80 (PAULOZZI *et al.*, 1986). Atualmente, surtos causados por EPEC são raros em países desenvolvidos, no entanto, estas bactérias ainda representam um importante agente diarreogênico em países em desenvolvimento (KAPER *et al.*, 2004; OCHOA *et al.*, 2008).

Estudos baseados em métodos moleculares e fenotípicos estimam que cepas EPEC sejam responsáveis por 10 - 20% de todos os casos de diarréia em crianças que vivem em países como Brasil, Chile, México, Tailândia e Tunísia (SCALETSKY *et al.*, 2002; RATCHTRACHENCHAI *et al.*, 2004; FRANZOLIN *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2005; AL-GALLAS *et al.*, 2007; ARAUJO *et al.*, 2007; OCHOA *et al.*, 2008; ESTRADA-GARCIA *et al.*, 2009).

As EPEC podem ser classificadas como típicas ou atípicas (TRABULSI *et al.*, 2002). Em 1995, Kaper criou o termo EPEC atípica para definir amostras *E. coli* que diferiam das EPEC típicas por não transportarem o plasmídeo *E. coli Adherence Factor* (pEAF) e das EHEC, por não possuírem os genes que codificam a toxina de Shiga (Stx). Atualmente, considera-se que a distinção entre cepas EPEC típica e atípica deve ser baseada na expressão ou não da fimbria *bundle forming pilus* (Bfp), codificada pelo operon *bfp*, localizado no pEAF; e na ausência da produção da toxina Stx (KAPER, 1996; BORTOLINI *et al.*, 1999; TRABULSI *et al.*, 2002; OCHOA *et al.*, 2008; ABE *et al.*, 2009; HERNANDES *et al.*, 2009).

Cepas EPEC atípica pertencem a um grupo diarreogênico que aumentou muito sua freqüência no Brasil nos últimos anos (FRANZOLIN *et al.*, 2005; BUERIS *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2008). Em algumas regiões do país, estas bactérias parecem ter substituído as EPEC típicas como principal agente diarreogênico. Isso indica que no Brasil, assim como ocorreu em países desenvolvidos, está havendo mudança no perfil epidemiológico das EPEC, de típicas para atípicas (TRABULSI *et al.*, 2002; AFSET *et al.*, 2003; FRANZOLIN *et al.*, 2005; BUERIS *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2008; OCHOA *et al.*, 2008; HERNANDES *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que cepas EPEC atípica, há alguns anos, só estavam presentes em países desenvolvidos associadas a surtos esporádicos de diarréia em crianças e adultos (JENKINS *et al.*, 2003; YATSUYANAGI *et al.*, 2003; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004). No Brasil estas bactérias estão associadas, principalmente com a diarréia endêmica na criança (SCALETSKY *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2001; FRANZOLIN *et al.*, 2005; BUERIS *et al.*, 2007).

As EPEC típicas e atípicas, assim como outros patótipos de ECD, tendem a formar grupos clonais que compartilham抗ígenos de superfície que definem seus sorogrupo e sorotipos. São três os抗ígenos de superfície que caracterizam as *E. coli*, o抗ígeno O (lipopolissacarídeo somático da membrana externa), H (抗ígeno protéico flagelar, responsável pela motilidade bacteriana) e K (polissacarídeo capsular) (NATARO e KAPER, 1998). Os sorogrupo são determinados com base no抗ígeno O, e os sorotipos com base na combinação dos抗ígenos O e H (O:H). Até o momento, já foram identificados pelo menos de 180抗ígenos O e 60抗ígenos H, os quais são determinados por meio de técnicas de soroaglutinação (ØRSKOV, 1984; ROBINS-BROWNE e HARTLAND, 2002).

Em algumas amostras o抗ígeno flagelar H não é expresso, sendo estas amostras classificadas como não-móveis (NM ou H-). Para determinar o抗ígeno H destas amostras, técnicas de tipagem molecular, baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) e na utilização de enzimas de restrição foram desenvolvidas (FIELDS *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2000). Este tipo de caracterização permite a análise mais precisa de amostras NM em estudos epidemiológicos, e também em estudos de relação clonal, já que diferenças no抗ígeno H podem explicar

diferentes origens clonais (FIELDS *et al.*, 1997; NATARO e KAPER, 1998; MACHADO *et al.*, 2000; RAMOS MORENO *et al.*, 2006).

Segundo a organização mundial de saúde (OMS) os principais sorogrupos de EPEC, também conhecidos como sorogrupos clássicos de EPEC, compreendem: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WHO, 1987). Em revisão, Trabulsi *et al.* (2002) verificaram diferentes aspectos genotípicos e fenotípicos das EPEC, concluindo que cepas típicas e atípicas constituem dois grupos distintos, representados por diferentes sorotipos. As EPEC típicas pertenceriam aos sorotipos: O55:H[6], O86:H34, O111:H[2], O114:H2, O119:H[6], O127:H6, O142:H6 e O142:H34, enquanto as EPEC atípicas aos sorotipos: O26:H[11], O55:H[7], O55:H[34], O86:H[8], O111ac:H[8], O111:H[9], O111:H25, O119:H2, O125:H6 e O128:H2.

Atualmente, além de cepas EPEC pertencentes aos sorogrupos clássicos, estudos têm demonstrado o isolamento de amostras EPEC atípica pertencentes a sorogrupos diferentes, conhecidos como não-clássicos (KRAUSE *et al.*, 2005; BLANCO *et al.*, 2006; YUSTE *et al.*, 2006; ARAUJO *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2008; MORENO *et al.*, 2008; HERNANDES *et al.*, 2009).

Independentemente dos sorogrupos ou sorotipos a que pertençam às amostras estudadas, existem muitas dificuldades em tentar relacionar sorotipos com patótipos de ECD. Esta dificuldade reside principalmente no fato de algumas amostras, representantes de diferentes patótipos, possuírem sorotipos idênticos. Amostras do sorotipo O26:H[11], por exemplo, podem ser EPEC ou STEC, dependendo da presença ou ausência de fatores de virulência que caracterizam cada um destes patótipos (LEOMIL *et al.*, 2005). Desta forma, a classificação de uma amostra como EPEC, ou como outro patótipo de ECD, deve ser baseada na detecção molecular e fenotípica de seus marcadores de virulência, sendo estas cepas pertencentes ou não a sorogrupos clássicos.

1.2 Fatores de virulência das EPEC e lesão *attaching and effacing*

A virulência das EPEC típica e atípica está relacionada, principalmente, a sua capacidade em aderir à superfície de enterócitos, e induzir vias de sinalização que resultam no surgimento de lesões intestinais. Estas lesões, inicialmente descritas por Cravioto *et al.* (1979), reduzem a capacidade de absorção dos intestinos, resultando em quadro de diarréia (NATARO e KAPER, 1998).

As lesões induzidas por estes patógenos são conhecidas como “*Attaching and Effacing*” (lesão A/E), e caracterizam-se pela aderência íntima da bactéria à membrana plasmática apical dos enterócitos, com destruição localizada dos microvilos absortivos. O contato bactéria-enterócito resulta no rearranjo do citoesqueleto da célula eucariota, com a formação de um pedestal rico em actina e outras proteínas do citoesqueleto, logo abaixo do local onde a bactéria se aderiu (MOON *et al.*, 1983; DONNENBERG e KAPER, 1992; NATARO e KAPER, 1998; CLARKE, 2001).

Os fatores necessários para o desenvolvimento da lesão A/E são codificados por uma ilha de patogênicidade cromossômica, de aproximadamente 35 Kb, conhecida como *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) (JERSE *et al.*, 1990; MCDANIEL *et al.*, 1995; ELLIOTT *et al.*, 1998). A região LEE das EPEC possui 41 *Open Reading Frames* (ORFs) organizadas em cinco grandes operons, LEE1 – LEE5 (ELLIOTT *et al.*, 1998; CLARKE, 2001).

Nos operons LEE1 até LEE3 estão presentes os genes *esc* (*E. coli secretion*), responsáveis pela expressão do sistema de secreção do tipo III (T3SS) das EPEC e EHEC. A função deste sistema é translocar proteínas do citoplasma bacteriano diretamente para o citoplasma da célula hospedeira (JARVIS *et al.*, 1995; KENNY e FINLAY, 1995).

No operon LEE4 estão presentes os genes *esp* (*E. coli secreted protein*), *sepL*, entre outros. Os produtos destes genes exercem diferentes funções que auxiliam no desenvolvimento das lesões A/E. No operon LEE5 estão presentes os genes *eae* (*E. coli attaching and effacing*) e *tir* (*translocated intimin receptor*), codificadores da proteína de membrana externa (OMP), intimina e seu receptor Tir, respectivamente. (JERSE e KAPER, 1991; KENNY e FINLAY, 1995; KENNY *et al.*,

1996; ABE *et al.*, 1997; KENNY *et al.*, 1997; KENNY e WARAWA, 2001; CLEARY *et al.*, 2004; KAPER *et al.*, 2004; O'CONNELL *et al.*, 2004).

Com relação às características estruturais dos genes presentes na região LEE, observa-se que os genes esc apresentam sequências de nucleotídeos altamente conservadas, enquanto que os genes presentes em LEE4 e LEE5 apresentam sequências variáveis, permitindo a identificação de diferentes subtipos (CHINA *et al.*, 1999; BIELASZEWSKA *et al.*, 2007a; HERNANDES *et al.*, 2009).

EspA, codificada pelo gene *espA*, é uma proteína filamentosa responsável pela adesão inicial das EPEC, e pela formação de um tubo de translocação na superfície bacteriana. Esta estrutura quando em contato com os enterócitos possui a função de translocar outras proteínas codificadas pela região LEE, bem como algumas proteínas não codificadas nesta região (FRANKEL *et al.*, 1998; KNUTTON *et al.*, 1998; CLEARY *et al.*, 2004; HERNANDES *et al.*, 2009).

Dentre as proteínas translocadas podemos citar EspB (codificada pelo gene *espB*) e EspD (codificada pelo gene *espD*) que agem sobre a membrana plasmática da célula eucariota, formando um poro. Este poro permite a passagem dos efetores Tir, EspS, entre outras proteínas diretamente para o citoplasma da célula eucariota (IDE *et al.*, 2001; CREASEY *et al.*, 2003; CLEARY *et al.*, 2004).

As proteínas translocadas possuem diferentes funções, como a desestruturação do citoesqueleto (EspB), perda da resistência transepitelial (EspF), desregulação da função mitocondrial (Map), entre outras (NATARO e KAPER, 1998). As funções de Tir compreendem a autoinserção na membrana da célula eucariota, servindo de receptor para a intimina, e a indução da polimerização de componentes do citoesqueleto eucarioto, induzindo o desenvolvimento do pedestal na superfície do enterócito (KENNY, 1999; KENNY e WARAWA, 2001; WARAWA e KENNY, 2001).

A intimina, descrita por Jerse e Kaper (1991), é uma proteína de 94KDa, cuja função é se ligar ao receptor Tir e induzir a formação do pedestal característico das lesões A/E (KAPER *et al.*, 2004). A porção N-terminal desta proteína é altamente conservada, enquanto sua porção C-terminal é variável, permitindo a identificação de diferentes subtipos (AGIN e WOLF, 1997; ADU-BOBIE *et al.*, 1998a; ADU-BOBIE

et al., 1998b; OSWALD *et al.*, 2000; JENKINS *et al.*, 2003). A presença de diferentes subtipos de intimina se deve provavelmente, ao fato deste gene sofrer intensa pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro (KAPER *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos sugerem que os diferentes subtipos de intimina permitem que as EPEC e EHEC tenham tropismo por diferentes tecidos (PHILLIPS e FRANKEL, 2000; FITZHENRY *et al.*, 2002a; FITZHENRY *et al.*, 2002b; MUNDY *et al.*, 2007), no entanto o fato das *E. coli* inserirem seu próprio receptor na célula hospedeira dificulta esta hipótese. Apesar disto, estudos relatam a possibilidade da intimina se ligar em mais de um receptor (FRANKEL *et al.*, 1994; FRANKEL *et al.*, 1995; PHILLIPS e FRANKEL, 2000). Isto pode ser comprovado em estudos, onde a intimina foi capaz de se ligar a nucleolina, uma proteína eucariota (SINCLAIR e O'BRIEN, 2004). Desta forma, a especificidade tecidual seria mediada por outros receptores além da intimina.

O tropismo tecidual mediado por EPEC e outras *E. coli* que expressam intimina parece ser dependente de múltiplos fatores, no qual o subtipo de intimina pode influenciar na aderência a diferentes tecidos, no entanto mais estudos são necessários (TORRES *et al.*, 2005).

No que se diz respeito a outros fatores de virulência, segundo Trabulsi *et al.* (2002), as EPEC típicas são mais homogêneas em seu perfil de virulência, quando comparadas com as EPEC atípicas. Com poucas exceções, cepas típicas expressam apenas os fatores de virulência contidos na região LEE e no pEAF. Em contraste, as EPEC atípicas freqüentemente expressam fatores de virulência não contidos na região LEE, como *Enteroaggregative E. coli Heat-Stable Enterotoxin* (EAST-1), Enterohemolisina (E-hlyA), adesina Afa, entre outros (DULGUER *et al.*, 2003; YATSUYANAGI *et al.*, 2003; LEOMIL *et al.*, 2005; BIELASZEWSKA *et al.*, 2007c; HERNANDES *et al.*, 2009). Desta forma, existem dois tipos de EPEC atípica, aquelas que expressam apenas fatores de virulência codificados pela região LEE, e aquelas que expressam fatores de virulência codificados pela região LEE e em outras regiões do genoma.

1.3 Reservatórios de EPEC

Cepas EPEC típica raramente são isoladas de animais, sendo o homem seu principal reservatório natural (TRABULSI *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003; NAKAZATO *et al.*, 2004). Em contraste, cepas EPEC atípica são isoladas de humanos e animais, com ou sem diarréia, em freqüências equivalentes, não permitindo a definição de um reservatório para estas bactérias (GOFFAUX *et al.*, 2000; CID *et al.*, 2001; PENTEADO *et al.*, 2002; BEUTIN *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2003; LEOMIL *et al.*, 2003; VETTORATO *et al.*, 2003; AKTAN *et al.*, 2004; NAKAZATO *et al.*, 2004; FRANZOLIN *et al.*, 2005; KRAUSE *et al.*, 2005; LEOMIL *et al.*, 2005; AIDAR-UGRINOVICH *et al.*, 2007).

Diversos estudos associam animais de estimação, de criação e alguns silvestres como possíveis reservatórios e fonte de infecção de EPEC atípica para humanos (CARVALHO *et al.*, 2003; NAKAZATO *et al.*, 2004; KRAUSE *et al.*, 2005; ISHII *et al.*, 2007). Apesar disto, nenhum comparou, de forma ampla, amostras isoladas de humanos e animais por técnicas como *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) para comprovar tais hipóteses.

Origens clonais comuns entre cepas bacterianas isoladas de animais e humanos podem identificar fontes de infecção e reservatórios animais de diferentes patógenos. Estudos neste sentido, envolvendo *E. coli* foram realizados, principalmente com *E. coli* uropatogênica (UPEC) (JOHNSON *et al.*, 2008a; JOHNSON *et al.*, 2008b).

Johnson *et al.* (2008a) compararam cepas UPEC isolada de cães com cepas *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) isoladas de humanos. As cepas isoladas de humanos possuíam as mesmas características genotípicas, filogenéticas e sorotipos que as amostras isoladas de cães. Estes autores concluíram que cepas UPEC isoladas de cães são potencialmente patogênicas para humanos, e que estes animais representam um reservatório destas bactérias.

Em estudo posterior Johnson *et al.* (2008b) compararam, por *Random-amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), cepas UPEC isoladas animais de companhia e de seres humanos. Nestas análises, os autores concluíram que animais e humanos são colonizados pelos menos clones

de UPEC e que a transmissão-cruzada destas bactérias entre humanos e animais ocorre.

Estudos com EPEC atípica têm focado, principalmente a comparação entre cepas isoladas de casos de diarréia com cepas isoladas de pacientes saudáveis (AFSET *et al.*, 2008). Faltando desta forma um estudo que esclareça, de forma ampla, as relações clonais existentes entre amostras EPEC atípica isoladas de humanos e animais.

O estudo comparativo entre amostras EPEC atípica isoladas de animais e humanos com e sem diarréia por MLST e PFGE, como foi proposto neste estudo, contribui para identificação de reservatórios e fontes de infecção de EPEC atípica no Brasil e em outros países.

1.4 Métodos de tipagem molecular para caracterização de cepas bacterianas

A análise epidemiológica molecular de cepas bacterianas, provenientes de diferentes origens é uma avaliação das relações de parentesco existente entre elas. A principal questão destas análises é saber se diferentes isolados de um determinado patógeno representam a disseminação de um organismo comum ou clone. Neste sentido a epidemiologia sempre tem buscado desenvolver técnicas que proporcionem uma melhor avaliação das relações existentes entre diferentes isolados bacterianos.

Com o advento da Biologia Molecular, nos anos 70, ficou claro que o cromossomo representa a molécula fundamental de identidade das bactérias, tornando possível a criação de novas técnicas epidemiológicas (PERSING e TENOVER, 2004). Nos últimos anos uma grande variedade de técnicas moleculares baseadas no estudo da similaridade dos cromossomos foi desenvolvida, dentre elas se destacam o *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e o *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (SCHWARTZ *et al.*, 1983; MAIDEN *et al.*, 1998).

O conceito básico das técnicas de tipagem molecular propõe que amostras bacterianas epidemiologicamente relacionadas possuem um precursor comum, desta forma, estudos utilizando estas técnicas permitem uma melhor compreensão

sobre os mecanismos evolutivos, surgimento de cepas virulentas e reservatórios de cepas bacterianas (PERSING e TENOVER, 2004)

1.5 Multilocus Sequence Typing (MLST)

O MLST é uma técnica de caracterização molecular e investigação epidemiológica proposta por Maiden *et al.* (1998), a qual também tem sido amplamente utilizada para inferência filogenética de espécies bacterianas (MAIDEN *et al.*, 1998; COOPER e FEIL, 2004; NEMOY *et al.*, 2005; HARBOTTLE *et al.*, 2006).

Esta técnica pode ser considerada uma variação do *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), pois também se baseia no estudo de diferentes alelos de *housekeeping genes*. A principal diferença entre estas duas metodologias, é que o MLEE analisa a mobilidade eletroforética de isoenzimas codificadas pelos *housekeeping genes* e o MLST analisa diretamente as seqüências destes genes, identificando pontos de mutação que caracterizam alelos distintos (HANNAGE *et al.*, 2004).

Diferenças de um único nucleotídeo entre seqüências de um mesmo *locus* são considerados diferentes alelos (MAIDEN *et al.*, 1998). O conjunto de alelos dos diferentes *loci* estudados no MLST determina o perfil alélico ou *sequence type* (ST) de uma cepa bacteriana. Os ST encontrados dentro de uma população bacteriana permitem o estudo comparativo de suas cepas, bem como a inferência filogenética de seus membros (MAIDEN *et al.*, 1998).

Uma das grandes vantagens do MLST é ser uma técnica baseada na seqüência de DNA e não em métodos eletroforéticos, esta característica permite uma análise de dados mais precisa, e também a troca de dados entre diferentes laboratórios com maior precisão, diferentemente das técnicas baseadas em eletroforese (MAIDEN *et al.*, 1998) (HANNAGE *et al.*, 2004).

Com respeito às análises filogenéticas, o MLST tem mostrado eficácia superior em relação ao PFGE. Em alguns estudos envolvendo cepas *E. coli* produtoras de β-lactmase de espetro estendido, e em outros envolvendo cepas *Salmonella enterica*, esta técnica conseguiu uma melhor diferenciação entre as

cepas estudadas em relação ao PFGE (NEMOY *et al.*, 2005; HARBOTTLE *et al.*, 2006). No entanto, comparações deste tipo ainda são controversas, visto que existem estudos que enfatizam a superioridade ou a mesma capacidade de resolução do PFGE nestas relações (LEOMIL *et al.*, 2005; JI *et al.*, 2006).

1.6 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

A técnica PFGE, desenvolvida por Schwartz *et al.* (1983) é considerada a ferramenta “padrão ouro” para diferenciação clonal de diversos patógenos bacterianos (PERSING e TENOVER, 2004). Este método tem se mostrado muito eficiente para identificar clones de *E. coli* que causam os surtos de diarréia (BENDER *et al.*, 1997; LEOMIL *et al.*, 2005; JI *et al.*, 2006). O princípio desta técnica consiste na separação de fragmentos de DNA de alto peso molecular, obtidos pela digestão do DNA genômico da bactéria com enzimas de restrição (GOERING, 2004).

Para separação destes fragmentos é utilizada corrente eletroforética, na qual a direção e intensidade dos pulsos elétricos aplicados são alteradas em diferentes intervalos de tempo. Este tipo de eletroforese permite que fragmentos de DNA de alto peso molecular se separem de melhor maneira em um gel de agarose, quando comparado com resultados obtidos em eletroforese convencional. O perfil de restrição gerado é utilizado para comparação clonal das amostras (SCHWARTZ *et al.*, 1983).

Diferentes metodologias para execução do PFGE já foram descritas, o que impedia a reproduzibilidade e comparação de resultados entre laboratórios. Para uma melhor reproduzibilidade e uniformidade entre laboratórios, foi criado o *Prevention PulseNet*, por meio da colaboração de diferentes laboratórios do U.S. Centers for Disease Control (CDC) (GOERING, 2004; RIBOT *et al.*, 2006).

O *PulseNet* definiu alguns aspectos que devem ser seguidos para realização desta técnica. Dentre eles incluem-se: (1) o cromossomo da bactéria deve ser isolado de forma intacta; (2) a qualidade da preparação das amostras deve permitir a ação de enzimas de restrição; e (3) a concentração do DNA deve ser o suficiente para a produção de bandas (GOERING, 2004).

Outros fatores que podem influenciar em resultados divergentes no PFGE, também foram estabelecidos: tipo de agarose e sua concentração (0,8 a 1,0%); espessura do gel (não deve ser muito fino); escolha do tampão (0,5x TBE); temperatura da câmara (14 °C); ângulo de reorientação (120°) e campo de força (6V/cm).

A enzima de restrição a ser utilizada deve ser uma endonuclease de corte raro, permitindo que o genoma bacteriano seja cortado em 10 à 30 fragmentos, com tamanhos diferentes e bem distribuídos.

6 CONCLUSÕES

- O perfil de virulência encontrado em cepas EPEC (típica e atípica) isoladas de animais é muito semelhante ao encontrado em EPEC (típicas e atípicas) isoladas de humanos, portanto cepas provenientes de animais são potenciais patógenos para seres humanos.
- A presença de fatores de virulência, como a enterohemolisina, em cepas EPEC atípica aumenta a capacidade destas bactérias de causar diarréia em crianças e também adultos.
- A necessidade de utilizar diferentes conjuntos de iniciadores para detecção de genes da região LEE, aliado ao fato de algumas cepas apresentarem subtipos de intimina e *tir* distintos, indica que as EPEC atípicas adquiriram suas regiões LEE de diferentes origens.
- As análises por MLST e PFGE mostraram que cepas EPEC atípicas isoladas de animais e humanos compartilham origens clonais comuns, sendo possível afirmar que animais atuam como reservatório e fonte de infecção de EPEC atípica para humanos.
- Pelo fato de humanos atuarem como reservatório de EPEC típica, e possivelmente de EPEC atípica, não pode ser descartada a hipótese de que humanos transmitam cepas EPEC para animais.
- Alguns sorotipos de EPEC atípica apresentam relações clonais muito próximas com a STEC EDL933 e outros com a cepa EPEC típica E2348/69, indicando que cepas EPEC atípica se originaram da perda de fatores de virulência característicos destes patótipos e/ou deram origem aos mesmos devido aquisição de fatores de virulência.
- Durante o estudo e investigação de surtos diarréicos causados por EPEC atípica, o papel de animais como possíveis fontes de contaminação devem ser considerados.

REFERÊNCIAS

ABE, A.; KENNY, B.; STEIN, M.; FINLAY, B. B. Characterization of two virulence proteins secreted by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*, EspA and EspB, whose maximal expression is sensitive to host body temperature. **Infect. Immun.**, v.65, p.3547-3555, 1997.

ABE, C. M.; TRABULSI, L. R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; MARTINEZ, M. B.; PIAZZA, R. M.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+), pEAF-negative, stx(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.64, p.357-365, 2009.

ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONCALVES, A. G.; TRABULSI, L. R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.662-668, 1998a.

ADU-BOBIE, J.; TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin alpha and intimin beta from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.66, p.5643-5649, 1998b.

AFSET, J. E.; ANDERSSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, p.2280-2290, 2008.

AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v.52, p.1015-1019, 2003.

AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.1137-1144, 2004.

AGIN, T. S.; WOLF, M. K. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. **Infect. Immun.**, v.65, p.320-326, 1997.

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D. L.; SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. **Int. J. Food. Microbiol.**, v.115, p.297-306, 2007.

AKTAN, I.; SPRIGINGS, K. A.; LA RAGIONE, R. M.; FAULKNER, L. M.; PAIBA, G. A.; WOODWARD, M. J. Characterisation of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. **Vet. Microbiol.**, v.102, p.43-53, 2004.

AL-GALLAS, N.; BAHRI, O.; BOURATBEEN, A.; BEN HAASEN, A.; BEN AISSA, R. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.77, p.571-582, 2007.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, p.3396-3399, 2007.

ARCHIE, J. W. A randomization test for phylogenetic information in systematic data. **Syst. Zoo.**, v.38, p.13, 1989.

BAGCIGIL, A. F.; IKIZ, S.; DOKUZEYLU, B.; BASARAN, B.; OR, E.; OZGUR, N. Y. Fecal shedding of *Salmonella* spp. in dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v.69, p.775-777, 2007.

BENDER, J. B.; HEDBERG, C. W.; BESSER, J. M.; BOXRUD, D. J.; MACDONALD, K. L.; OSTERHOLM, M. T. Surveillance by molecular subtype for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. **N. Engl. J. Med.**, v.337, p.388-394, 1997.

BEUTIN, L.; KAULFUSS, S.; HEROLD, S.; OSWALD, E.; SCHMIDT, H. Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.1552-1563, 2005.

BEUTIN, L.; MARCHES, O.; BETTELHEIM, K. A.; GLEIER, K.; ZIMMERMANN, S.; SCHMIDT, H.; OSWALD, E. HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. **Infect. Immun.**, v.71, p.3995-4002, 2003.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M. A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, p.2559-2564, 1989.

BIELASZEWSKA, M.; DOBRINDT, U.; GARTNER, J.; GALLITZ, I.; HACKER, J.; KARCH, H.; MULLER, D.; SCHUBERT, S.; ALEXANDER SCHMIDT, M.; SORSA, L. J.; ZDZIARSKI, J. Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.297, p.625-639, 2007a.

BIELASZEWSKA, M.; MIDDENDORF, B.; KOCH, R.; FRIEDRICH, A. W.; FRUTH, A.; KARCH, H.; SCHMIDT, M. A.; MELLMANN, A. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. **Clin. Infect. Dis.**, v.47, p.208-217, 2008.

BIELASZEWSKA, M.; PRAGER, R.; KOCH, R.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; TSCHAPE, H.; TARR, P. I.; KARCH, H. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, p.3144-3150, 2007b.

BIELASZEWSKA, M.; SONNTAG, A. K.; SCHMIDT, M. A.; KARCH, H. Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. **Microbes Infect.**, v.9, p.891-897, 2007c.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M. P.; VARELA, G.; GADEA, M. P.; SCHELOTTO, F.; GONZALEZ, E. A.; BLANCO, J. Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (muB and xiR/beta2B). **J. Med. Microbiol.**, v.55, p.1165-1174, 2006.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P.; DAHBI, G.; GONZALEZ, E. A.; BERNARDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.1351-1356, 2003.

BLANCO, M.; SCHUMACHER, S.; TASARA, T.; ZWEIFEL, C.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; STEPHAN, R. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2). **BMC Microbiol.**, v.5, p.23, 2005.

BOKETE, T. N.; WHITTAM, T. S.; WILSON, R. A.; CLAUSEN, C. R.; O'CALLAHAN, C. M.; MOSELEY, S. L.; FRITSCHE, T. R.; TARR, P. I. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. **J. Infect. Dis.**, v.175, p.1382-1389, 1997.

BORTOLINI, M. R.; TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; FRANKEL, G.; SPERANDIO, V. Lack of expression of bundle-forming pili in some clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is due to a conserved large deletion in the *bfp* operon. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.179, p.169-174, 1999.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neopolitanum* from summer diarrhoea of infants. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.57, p.239-247, 1945.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; DOS SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, p.839-844, 2007.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, p.545-552, 2004.

CAMPOS, L. C.; WHITTAM, T. S.; GOMES, T. A.; ANDRADE, J. R.; TRABULSI, L. R. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infect. Immun.**, v.62, p.3282-3288, 1994.

CANTOR, G. H.; NELSON, S., JR.; VANEK, J. A.; EVERMANN, J. F.; ERIKS, I. S.; BASARABA, R. J.; BESSER, T. E. *Salmonella spp.* shedding in racing sled dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.9, p.447-448, 1997.

CARVALHO, V. M.; GYLES, C. L.; ZIEBELL, K.; RIBEIRO, M. A.; CATAO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I. L.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.1225-1234, 2003.

CARVALHO, V. M.; IRINO, K.; ONUMA, D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Random amplification of polymorphic DNA reveals clonal relationships among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from non-human primates and humans. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.40, p.237-241, 2007.

CASTILLO, A.; EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V. A genomic population genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia coli*: the search for the unit of selection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, p.1542-1547, 2005.

CHINA, B.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.178, p.177-182, 1999.

CID, D.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; MARIN, I.; SANZ, R.; ORDEN, J. A.; AMILS, R.; DE LA FUENTE, R. Association between intimin (eae) and espB gene subtypes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs and goat kids. **Microbiology**, v.147, p.2341-2353, 2001.

CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.41, p.93-98, 2001.

CLEARY, J.; LAI, L. C.; SHAW, R. K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M. S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v.150, p.527-538, 2004.

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing--what is resolved? **Trends Microbiol.**, v.12, p.373-377, 2004.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v.3, p.95 - 99, 1979.

CREASEY, E. A.; FRIEDBERG, D.; SHAW, R. K.; UMANSKI, T.; KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; FRANKEL, G. CesAB is an enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB. **Microbiology**, v.149, p.3639-3647, 2003.

CREPIN, V. F.; SHAW, R.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. Molecular basis of antigenic polymorphism of EspA filaments: development of a peptide display technology. **J. Mol. Biol.**, v.350, p.42-52, 2005.

DEMING, M. S.; TAUXE, R. V.; BLAKE, P. A.; DIXON, S. E.; FOWLER, B. S.; JONES, T. S.; LOCKAMY, E. A.; PATTON, C. M.; SIKES, R. O. *Campylobacter enteritis* at a university: transmission from eating chicken and from cats. **Am. J. Epidemiol.**, v.126, p.526-534, 1987.

DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.60, p.3953-3961, 1992.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v.107, p.539-548, 2001.

DRASSAR, B. S.; HILL, M. J. (Ed.). **Human intestinal flora**. London: Acad. Press, 1974. p.36-43.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v.188, p.1685-1694, 2003.

DURIEZ, P.; ZHANG, Y.; LU, Z.; SCOTT, A.; TOPP, E. Loss of virulence genes in *Escherichia coli* populations during manure storage on a commercial swine farm. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.74, p.3935-3942, 2008.

ELLIOTT, S. J.; WAINWRIGHT, L. A.; MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DENG, Y. K.; LAI, L. C.; MCNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.**, v.28, p.1-4, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; LOPEZ-SAUCEO, C.; THOMPSON-BONILLA, R.; ABONCE, M.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; SANTOS, J. I.; ROSADO, J. L.; DUPONT, H. L.; LONG, K. Z. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v.47, p.93-98, 2009.

FIELDS, P. I.; BLOM, K.; HUGHES, H. J.; HELSEL, L. O.; FENG, P.; SWAMINATHAN, B. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.1066-1070, 1997.

FITZHENRY, R. J.; PICKARD, D. J.; HARTLAND, E. L.; REECE, S.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Gut**, v.50, p.180-185, 2002a.

FITZHENRY, R. J.; REECE, S.; TRABULSI, L. R.; HEUSCHKEL, R.; MURCH, S.; THOMSON, M.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. **Infect. Immun.**, v.70, p.4362-4368, 2002b.

FORESTIER, C.; MEYER, M.; FAVRE-BONTE, S.; RICH, C.; MALPUECH, G.; LE BOUGUENEC, C.; SIROT, J.; JOLY, B.; DE CHAMPS, C. Enteroadherent *Escherichia coli* and diarrhea in children: a prospective case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.2897-2903, 1996.

FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A.; WIELER, L. H.; BALJER, G.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.2460-2463, 1994.

FRANKEL, G.; CANDY, D. C.; EVEREST, P.; DOUGAN, G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. **Infect. Immun.**, v.62, p.1835-1842, 1994.

FRANKEL, G.; CANDY, D. C.; FABIANI, E.; ADU-BOBIE, J.; GIL, S.; NOVAKOVA, M.; PHILLIPS, A. D.; DOUGAN, G. Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.63, p.4323-4328, 1995.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v.30, p.911-921, 1998.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C.; KELLER, R.; GOMES, T. A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p.359-363, 2005.

GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; PARRO, V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. **Clin. Chem.**, v.52, p.192-201, 2006.

GOERING, R. V. Pulsed-field gel electrophoresis. In: PERSING, D. H. (Ed.). **Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice**. Washington: ASM Press, 2004. p.185-196.

GOFFAUX, F.; CHINA, B.; JANSSEN, L.; MAINIL, J. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. **Res. Microbiol.**, v.151, p.865-871, 2000.

GONCALVES, A. G.; CAMPOS, L. C.; GOMES, T. A.; RODRIGUES, J.; SPERANDIO, V.; WHITTAM, T. S.; TRABULSI, L. R. Virulence properties and clonal structures of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes. **Infect. Immun.**, v.65, p.2034-2040, 1997.

GUNZBURG, S. T.; TORNIEPORTH, N. G.; RILEY, L. W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.1375-1377, 1995.

HALL, B. G. (Ed.). **Phylogenetics trees made easy. A how to manual for molecular biologists**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2001. p.179.

HANAGE, P.; FEIL, E. J.; BRUEGGEMANN, A. B.; SPRATT, B. G. Multilocus Sequence Typing: Strain Characterization, Population Biology, and Patterns of Evolution Descent. In: PERSING, D. H. (Ed.). **Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice**. Washington: ASM Press, 2004. p.235-243.

HARBOTTLE, H.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; ZHAO, S. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.2449-2457, 2006.

HEDBERG, C. W.; SAVARINO, S. J.; BESSER, J. M.; PAULUS, C. J.; THELEN, V. M.; MYERS, L. J.; CAMERON, D. N.; BARRETT, T. J.; KAPER, J. B.; OSTERHOLM, M. T. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. **J. Infect. Dis.**, v.176, p.1625-1628, 1997.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A.; GOMES, T. A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.297, p.137-149, 2009.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v.17, p.754-755, 2001.

HUSON, D. H. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. **Bioinformatics**, v.14, p.68-73, 1998.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Mol. Biol. Evol.**, v.23, p.254-267, 2006.

HUSSEIN, H. S.; BOLLINGER, L. M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. **J. Food. Prot.**, v.68, p.2224-2241, 2005.

IDE, T.; LAARMANN, S.; GREUNE, L.; SCHILLERS, H.; OBERLEITHNER, H.; SCHMIDT, M. A. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v.3, p.669-679, 2001.

ISHII, S.; MEYER, K. P.; SADOWSKY, M. J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, p.5703-5710, 2007.

JARVIS, K. G.; GIRON, J. A.; JERSE, A. E.; MCDANIEL, T. K.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.7996-8000, 1995.

JENKINS, C.; LAWSON, A. J.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G. A.; WRIGHT, P.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G.; SMITH, H. R. Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. **Mol. Cell Probes**, v.17, p.149-156, 2003.

JERSE, A. E.; KAPER, J. B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infect. Immun.**, v.59, p.4302-4309, 1991.

JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D.; KAPER, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.7839-7843, 1990.

JI, R.; LI, Y. J.; WANG, Y. P.; CUI, S. H.; JIANG, T. Comparison of multilocus sequence typing system and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Salmonella enteritidis*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v.27, p.1065-1068, 2006.

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C. R.; KUSKOWSKI, M. A.; ROBERTS, E.; DEBROY, C. Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, p.417-422, 2008a.

JOHNSON, J. R.; OWENS, K.; GAJEWSKI, A.; CLABOTS, C. *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. **J. Infect. Dis.**, v.197, p.218-224, 2008b.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.3, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.2, p.123-140, 2004.

KAPPERUD, G.; SKJERVE, E.; BEAN, N. H.; OSTROFF, S. M.; LASSEN, J. Risk factors for sporadic *Campylobacter* spp. infections: results of a case-control study in southeastern Norway. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.3117-3121, 1992.

KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Mol. Microbiol.**, v.31, p.1229-1241, 1999.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D. J.; FREY, E. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v.91, p.511-520, 1997.

KENNY, B.; FINLAY, B. B. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.7991-7995, 1995.

KENNY, B.; LAI, L. C.; FINLAY, B. B.; DONNENBERG, M. S. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v.20, p.313-323, 1996.

KENNY, B.; WARAWA, J. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. **Infect. Immun.**, v.69, p.1444-1453, 2001.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLENT, M. J.; NISAN, I.; NEVES, B. C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.**, v.17, p.2166-2176, 1998.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Vet. Microbiol.**, v.106, p.87-95, 2005.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v.23, p.2947-2948, 2007.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B. E.; IRINO, K.; VETTORATO, M. P.; ONUMA, D. L.; DE CASTRO, A. F. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.97, p.103-109, 2003.

LEOMIL, L.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; KRAUSE, G.; SCHMIDT, H.; BEUTIN, L. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.249, p.335-342, 2005.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiol. Rev.**, v.6, p.31-51, 1984.

MACHADO, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. **Res. Microbiol.**, v.151, p.535-546, 2000.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.3140-3145, 1998.

MAIRENA, E. C.; NEVES, B. C.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Curr. Microbiol.**, v.48, p.412-418, 2004.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.1664-1668, 1995.

MELLMANN, A.; BIELASZEWSKA, M.; KARCH, H. Intrahost genome alterations in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Gastroenterology**, v.136, p.1925-1938, 2009.

MELLMANN, A.; BIELASZEWSKA, M.; ZIMMERHACKL, L. B.; PRAGER, R.; HARMSEN, D.; TSCHAPE, H.; KARCH, H. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen. **Clin. Infect. Dis.**, v.41, p.785-792, 2005.

MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S.; TAKAYA, S.; SAKAI, N.; MIYAZAKI, M.; ONO, A.; YANAGAWA, H. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. **Am. J. Epidemiol.**, v.150, p.787-796, 1999.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v.41, p.1340-1351, 1983.

MORATO, E. P.; LEOMIL, L.; BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; MOURA, R. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Domestic Cats Constitute a Natural Reservoir of Human Enteropathogenic *Escherichia coli* Types. **Zoo. Public Health**, v.56, p.229-237, 2008.

MOREIRA, F. C.; VIEIRA, M. A.; FERREIRA, A. J.; GIRAO, D. M.; VAZ, T. M.; ROSA, A. C.; KNOBL, T.; IRINO, K.; FREYMULLER, E.; GOMES, T. A. *Escherichia coli* strains of serotype O51:H40 comprise typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains and are potentially diarrheagenic. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, p.1462-1465, 2008.

MORENO, A. C.; FILHO, A. F.; GOMES, T. D.; RAMOS, S. T.; MONTEMOR, L. P.; TAVARES, V. C.; FILHO, L. D.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 2008.

MUNDY, R.; SCHULLER, S.; GIRARD, F.; FAIRBROTHER, J. M.; PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Functional studies of intimin in vivo and ex vivo: implications for host specificity and tissue tropism. **Microbiology**, v.153, p.959-967, 2007.

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A.; IRINO, K.; DA SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Vet. Microbiol.**, v.101, p.269-277, 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, p.142-201, 1998.

NEMOY, L. L.; KOTETISHVILI, M.; TIGNO, J.; KEEFER-NORRIS, A.; HARRIS, A. D.; PERENCEVICH, E. N.; JOHNSON, J. A.; TORPEY, D.; SULAKVELIDZE, A.; MORRIS, J. G., JR.; STINE, O. C. Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.1776-1781, 2005.

NETER, E.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O.; GINO, R. M.; GORZYNSKI, E. A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v.16, p.801-808, 1955.

NEVES, B. C.; KNUTTON, S.; TRABULSI, L. R.; SPERANDIO, V.; KAPER, J. B.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Molecular and ultrastructural characterisation of EspA from different enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.169, p.73-80, 1998.

NEVES, B. C.; SHAW, R. K.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Polymorphisms within EspA filaments of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.71, p.2262-2265, 2003.

NGUYEN, R. N.; TAYLOR, L. S.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, p.597-603, 2006.

NIELSEN, E. M.; ANDERSEN, M. T. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.2884-2893, 2003.

NYLANDER, J. A.; RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; NIEVES-ALDREY, J. L. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. **Syst. Biol.**, v.53, p.47-67, 2004.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.102, p.852-856, 2008.

O'CONNELL, C. B.; CREASEY, E. A.; KNUTTON, S.; ELLIOTT, S.; CROWTHER, L. J.; LUO, W.; ALBERT, M. J.; KAPER, J. B.; FRANKEL, G.; DONNENBERG, M. S. SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. **Mol. Microbiol.**, v.52, p.1613-1625, 2004.

OOKA, T.; VIEIRA, M. A.; OGURA, Y.; BEUTIN, L.; LA RAGIONE, R.; VAN DIEMEN, P. M.; STEVENS, M. P.; AKTAN, I.; CAWTHRAW, S.; BEST, A.; HERNANDES, R. T.; KRAUSE, G.; GOMES, T. A.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. Characterization of tccP2 carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.271, p.126-135, 2007.

ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. Serotyping of *Escherichia coli*. In: BERGAN, T. (Ed.). **Methods in Microbiology**. New York: Acad. Press, 1984. p.43-112.

OSWALD, E.; SCHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHES, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infect. Immun.**, v.68, p.64-71, 2000.

PAULOZZI, L. J.; JOHNSON, K. E.; KAMAHELE, L. M.; CLAUSEN, C. R.; RILEY, L. W.; HELGERSON, S. D. Diarrhea associated with adherent enteropathogenic *Escherichia coli* in an infant and toddler center, Seattle, Washington. **Pediatrics**, v.77, p.296-300, 1986.

PEIXOTO, J. C.; BANDO, S. Y.; ORDONEZ, J. A.; BOTELHO, B. A.; TRABULSI, L. R.; MOREIRA-FILHO, C. A. Genetic differences between *Escherichia coli* O26 strains isolated in Brazil and in other countries. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.196, p.239-244, 2001.

PELAYO, J. S.; SCALETSKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; SPERANDIO, V.; GIRON, J. A.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L. R. Virulence properties of atypical EPEC strains. **J. Med. Microbiol.**, v.48, p.41-49, 1999.

PENTEADO, A. S.; UGRINOVICH, L. A.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; ANDRADE, J. R.; CORREA, S. S.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Serobiotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.89, p.41-51, 2002.

PERSING, D. H (Ed.). **Molecular microbiology**: diagnostic principles and practice. Washington: ASM Press, 2004. cap.15, p.185-196.

PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.1496-1500, 2000.

POSADA, D. Using MODELTEST and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. **Curr. Protoc. Bioinformatics**, cap. 6, 2003.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v.14, p.817-818, 1998.

POSPISCHIL, A.; MAINIL, J. G.; BALJER, G.; MOON, H. W. Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and cats with diarrhea. **Vet. Pathol.**, v.24, p.330-334, 1987.

PRAGER, R.; FRUTH, A.; SIEWERT, U.; STRUTZ, U.; TSCHAPE, H. *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.299, p.343-353, 2009.

RAMOS MORENO, A. C.; CABILIO GUTH, B. E.; BAQUERIZO MARTINEZ, M. Can the fliC PCR-restriction fragment length polymorphism technique replace classic serotyping methods for characterizing the H antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains? **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.1453-1458, 2006.

RATCHTRACHENCHAI, O. A.; SUBPASU, S.; HAYASHI, H.; BA-THEIN, W. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.237-243, 2004.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Shigella* spp. for PulseNet. **Foodborne Pathog. Dis.**, v.3, p.59-67, 2006.

ROBINS-BROWNE, R. M.; BORDUN, A. M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V. R.; RUSSELL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N. A.; BETTELHEIM, K. A.; FAIRLEY, C. K.; SINCLAIR, M. I.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, p.1797-1805, 2004.

ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.17, p.467-475, 2002.

ROBINSON, R. A.; PUGH, R. N. Dogs, zoonoses and immunosuppression. **J. R. Soc. Promot. Health**, v.122, p.95-98, 2002.

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I. C.; CAMPOS, L. C.; GOMES, T. A.; WHITTAM, T. S.; TRABULSI, L. R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.**, v.64, p.2680-2686, 1996.

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C. M.; LOPES, C. A.; DANTAS, L. O. Concurrent infection in a dog and colonization in a child with a human enteropathogenic *Escherichia coli* clone. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.1388-1389, 2004.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p.1572-1574, 2003.

ROWE, B. The role of *Escherichia coli* in gastroenteritis. **Clin. Gastroenterol.**, v.8, p.625-644, 1979.

SALFIELD, N. J.; PUGH, E. J. *Campylobacter enteritis* in young children living in households with puppies. **Br. Med. J.**, v.294, p.21-22, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. (Ed.). **The condensed protocols from Molecular cloning:** a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. p.309-312.

SATO, Y.; MORI, T.; KOYAMA, T.; NAGASE, H. *Salmonella virchow* infection in an infant transmitted by household dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.767-769, 2000.

SCALETSKY, I. C.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L.; NUNES, C. R.; MARANHAO, H. S.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.645-648, 2002.

SCALETSKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C. A.; CARVALHO, R. L.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v.67, p.3410-3415, 1999.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infect. Immun.**, v.63, p.1055-1061, 1995.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L. H.; KARCH, H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.1205-1208, 2000.

SCHWARTZ, D. C.; SAFFRAN, W.; WELSH, J.; HAAS, R.; GOLDENBERG, M.; CANTOR, C. R. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. **Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.**, v.47, p.189-195, 1983.

SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; SAID, B.; WILLSHAW, G. A.; STOKES, N.; ROWE, B. Use of gene probes and adhesion tests to characterise *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. **J. Med. Microbiol.**, v.44, p.438-443, 1996.

SINCLAIR, J. F.; O'BRIEN, A. D. Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.33751-33758, 2004.

SMITH, H.; SCOTLAND, S.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.; ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v.27, 1996.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v.24, p.1596-1599, 2007.

TARR, C. L.; WHITTAM, T. S. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.184, p.479-487, 2002.

TENNANT, S. M.; TAUSCHEK, M.; AZZOPARDI, K.; BIGHAM, A.; BENNETT-WOOD, V.; HARTLAND, E. L.; QI, W.; WHITTAM, T. S.; ROBINS-BROWNE, R. M. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. **BMC Microbiol.**, v.9, p.117, 2009.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infect. Immun.**, v.73, p.18-29, 2005.

TRABULSI, L. R.; CAMPOS, L.; WHITTAM, T.; GOMES, T.; RODRIGUES, J.; GONÇALVES, A. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.1-6, 1996.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.508-513, 2002.

TSAI, H. J.; HUANG, H. C.; TSAI, H. L.; CHANG, C. C. PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens and dogs in northern Taiwan. **J. Vet. Med. Sci.**, v.68, p.815-819, 2006.

USEIN, C. R.; TATU-CHITOIU, D.; CIONTEA, S.; CONDEI, M.; DAMIAN, M. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in Romanian children younger than 5 years of age. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v.62, p.289-293, 2009.

VALLE, G. R.; GOMES, T. A.; IRINO, K.; TRABULSI, L. R. The traditional enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.152, p.95-100, 1997.

VETTORATO, M. P.; LEOMIL, L.; GUTH, B. E.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of Sao Paulo, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.95, p.103-109, 2003.

VIDAL, M.; KRUGER, E.; DURAN, C.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V.; TORO, C.; VIDAL, R. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.5362-5365, 2005.

VIEIRA, M. A.; ANDRADE, J. R.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C.; DIAS, A. M.; RAMOS, S. R.; FRANKEL, G.; GOMES, T. A. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.762-772, 2001.

VILJANEN, M. K.; PELTOLA, T.; JUNNILA, S. Y.; OLKKONEN, L.; JARVINEN, H.; KUISTILA, M.; HUOVINEN, P. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet**, v.336, p.831-834, 1990.

WARAWA, J.; KENNY, B. Phosphoserine modification of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation. **Mol. Microbiol.**, v.42, p.1269-1280, 2001.

WHITTAM, T. S.; MCGRAW, T. E. A. Clonal analysis of EPEC serogroups. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.7-16, 1996.

WHITTAM, T. S.; WOLFE, M. L.; WACHSMUTH, I. K.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; WILSON, R. A. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v.61, p.1619-1629, 1993.

WILGENBUSCH, J. C.; SWOFFORD, D. Inferring evolutionary trees with PAUP*. **Curr. Protoc. Bioinformatics**, Cap. 6: Unit:6.4, 2003.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. **J. Hered.**, v.92, p.371-373, 2001.

YAMAMOTO, T.; WAKISAKA, N.; SATO, F.; KATO, A. Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.147, p.89-95, 1997.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.2033-2039, 2003.

YUSTE, M.; DE LA FUENTE, R.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; CID, D.; ORDEN, J. A. Detection of the *astA* (EAST1) gene in attaching and effacing *Escherichia coli* from ruminants. **J. Vet. Med.**, v.53, p.75-77, 2006.