

KAMILA OLIVEIRA NUNES

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA E UROPATOGÊNICA

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

São Paulo
2016

KAMILA OLIVEIRA NUNES

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA E
UROPATOGÊNICA**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Nunes, Kamila Oliveira.

Relações filogenéticas entre *Escherichia coli* enteroagregativa e uropatogênica / Kamila Oliveira Nunes. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Patogenicidade bacteriana.

Versão do título para o inglês: Phylogenetic relationship among enteroaggregative and uropathogenic *Escherichia coli* strains.

1. *Escherichia coli* 2. Filogenia 3. Infecção bacteriana I. Elias Júnior, Prof. Dr. Waldir Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0201/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Kamila Oliveira Nunes.

Título da Dissertação: Relações filogenéticas entre *Escherichia coli* enteroagregativa e uropatogênica.

Orientador(a): Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Júnior.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **619/13** referente ao projeto intitulado: “*Relações filogenéticas entre Escherichia coli Enteroagregativa e Uropatogênica*” sob a responsabilidade de **Kamila Oliveira Nunes**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 24 de setembro de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico este trabalho a meus pais por todo incentivo que me deram nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a meus protetores espirituais por terem me ajudado e me guiado por todo este tempo.

Ao Dr. Waldir P. Elias Jr. Por todo ensinamento, compreensão, paciência, orientação e amizade a mim prestados durante estes 5 anos de trabalho conjunto. Muito obrigada.

As Doutoras Rosa Silva e Tânia Amaral pela colaboração e ajuda prestada no projeto. e a Doutora Silva Bando pela ajuda na elaboração da árvore filogenética do trabalho. Muito obrigada.

Ao Laboratório do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan pela ajuda nos sequenciamentos dos genes estudados.

A todos os funcionários e amigos do laboratório de bacteriologia do Instituto Butantan, os quais permitiram que o trabalho fosse mais fácil e leve. Obrigada pelo companheirismo e risadas ao longo do tempo.

A minha amiga-irmã Indiara, que me ajudou, aconselhou, escutou, riu, chorou e bailou comigo nestes anos.

Aos meus pais, Luigi e Solange, e a todos os meus familiares, pelo apoio, carinho, amor e, claro, pelos puxões de orelha sempre que necessário. Amo vocês.

Ao meu companheiro de vida, Claudio, por estar ao meu lado sempre, me ajudando no que for necessário, por me cuidar e amar. Obrigada por tudo anjo, amo você.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

NUNES, K. O. **Relações filogenéticas entre *Escherichia coli* enteroagregativa e uropatogênica.** 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Escherichia coli isoladas de infecções do trato urinário (ITU) são conhecidas como *E. coli* uropatogênicas (UPEC). Dentre as *E. coli* diarreiogênicas, o patótipo denominado *E. coli* enteroagregativa (EAEC) é definido pela produção do padrão de adesão agregativa em células epiteliais cultivadas. Estudos recentes mostraram que algumas cepas de UPEC albergam propriedades de virulência de EAEC, indicando que cepas de EAEC podem causar ITU. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi analisar as relações filogenéticas entre cepas de EAEC que apresentam marcadores genéticos de *E. coli* extraintestinais (ExPEC) e cepas de UPEC com e sem marcadores genéticos de EAEC. Para tal, foram selecionadas 92 EAEC, 8 UPEC com e 10 sem marcadores de EAEC. As 92 EAEC foram analisadas quanto à presença dos genes considerados como marcadores de cepas de ExPEC (*papA/papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA*, *kpsMT II*), detectando 30 (32,6%) cepas com esse perfil. Estas 30 cepas foram selecionadas para análises de filogrupos e *multilocus sequence type* (MLST) junto às cepas de UPEC. Foi observado que 17 (54,4%) cepas de EAEC e 3 (16,6%) de UPEC pertenceram ao filogrupo A, 2 (6,45%) EAEC e 1 (5,5%) UPEC ao filogrupo B1, 3 (9,68%) EAEC e 8 (44,4%) UPEC ao filogrupo B2, 6 (19,35%) EAEC e 2 (11,1%) UPEC ao filogrupo D, 1 (3,2%) EAEC e 4 (22,2%) UPEC ao filogrupo E, 1 (3,2%) EAEC ao filogrupo F e 1 EAEC (3,2%) não pôde ser classificada de acordo com esta metodologia. Comparando os dois grupos de UPEC notou-se que dentre as cepas com marcadores de EAEC 3 (37,5%) pertenceram ao filogrupo E, 2 (25%) aos filogrupos A e D e 1 (12,5%) ao filogrupo B1. Dentre as cepas sem marcadores de EAEC 1 (10%) pertenceu ao filogrupo A, 1 (10%) ao filogrupo E e 8 (80%) ao filogrupo B2. As análises de MLST através do sequenciamento dos genes *recA*, *fumC*, *icd*, *mdh*, *purA*, *adk* e *gyrB* permitiram determinar 42 sequence types (ST) distintos, dos quais 22 foram descritos neste estudo. Os mais comuns foram o ST 10 (5 cepas) e ST 95 e ST 746 (ambos com 2 cepas cada). A árvore filogenética gerada confirmou esses dados, mostrando o agrupamento das cepas de EAEC com marcadores de ExPEC com as cepas de UPEC com marcadores de EAEC. Em resumo, o presente estudo mostrou que um subgrupo de cepas de EAEC está inserido nos mesmos grupos filogenéticos de cepas de UPEC com marcadores de EAEC apresentando, portanto, correlação filogenética. Houve diferenças de distribuição filogenética entre cepas de UPEC com e sem marcador de EAEC. Conclui-se que cepas de EAEC podem apresentar potencial uropatogênico, tanto no curso de uma infecção diarreica, quanto em carregadores assintomáticos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Filogenia. Infecção bacteriana.

ABSTRACT

NUNES, K. O. **Phylogenetic relationship among enteroaggregative and uropathogenic *Escherichia coli* strains.** 2015. 97 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Escherichia coli isolated from urinary tract infections (UTI) are known as uropathogenic *E. coli* (UPEC). Among the diarrheagenic *E. coli*, the enteroaggregative *E. coli* (EAEC) pathotype is defined by the production of the aggregative adherence on cultured epithelial cells. Recent studies have shown that some UPEC strains harbor virulence properties of EAEC, indicating that EAEC strains can cause UTI. Therefore, the aim of this study was to analyze the phylogenetic relationships among EAEC strains that have genetic markers of extraintestinal *E. coli* (ExPEC) and UPEC strains, with and without genetic markers of EAEC. For that reason, we selected 92 EAEC, 8 UPEC with and 10 without EAEC markers. The 92 EAEC were analyzed for the presence of genes considered as markers for ExPEC strains (*papA/papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA*, *kpsMT II*), detecting 30 (32.6%) strains with that profile. These 30 strains were selected for phylogroup and multilocus sequence type (MLST) analysis with the UPEC strains. It was observed that 17 (54.4%) EAEC and 3 (16.6%) UPEC belonged to the phylogroup A, 2 (6.45%) EAEC and 1 (5.5%) UPEC to the phylogroup B1, 3 (9.68%) EAEC and 8 (44.4%) UPEC to the phylogroup B2, 6 (19.35%) EAEC and 2 (11.1%) UPEC to the phylogroup D, 1 (3.2%) EAEC and 4 (22.2%) UPEC to the phylogroup E, 1 (3.2%) EAEC to the phylogroup F and 1 (3.2%) EAEC could not be classified according to this methodology. Comparing the two groups of UPEC it was observed that among the UPEC strains with EAEC markers, 3 (37.5%) belonged to the phylogroup E, 2 (25%) to the phylogroups A and D and 1 (12.5%) to the phylogroup B1. Among the UPEC strains without EAEC markers, 1 (10%) belonged to the phylogroup A, 1 (10%) to the phylogroup E and 8 (80%) to the phylogroup B2. The MLST analysis by sequencing of *recA*, *fumC*, *icd*, *mdh*, *purA*, *adk* and *gyrB* genes allowed to determine 42 distinct sequence types (ST), of whom, 22 were described in this study. The most common were ST 10 (5 strains), and ST 95 and ST 746 (both with two strains each). The phylogenetic tree generated confirmed that data, showing the clustering of EAEC strains (harboring ExPEC markers) with the UPEC strains (harboring EAEC markers). In summary, the current study showed that a subgroup of EAEC strains are clustered in the same phylogenetic groups of UPEC strains with EAEC markers and, thus, present phylogenetic correlation. Also, there were differences in phylogenetic distribution among UPEC strains with and without EAEC markers. In conclusion, EAEC strains may have uropathogenic potential, either in the course of a diarrheal infection or in asymptomatic carriers.

Keywords: *Escherichia coli*. Phylogeny. Bacterial infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- ESQUEMA DOS ESTÁGIOS DA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO POR UPEC. _____	19
FIGURA 2- ESQUEMA DA PATOGÊNESE DOS SEIS PATÓTIPOS DE DEC RECONHECIDOS. _____	22
FIGURA 3- PADRÕES DE ADESÃO APRESENTADOS POR CEPAS DE EPEC TÍPICA (AL) E ATÍPICA (LA-L). _____	23
FIGURA 4- PADRÃO DE ADESÃO DIFUSO (AD) _____	26
FIGURA 5- PADRÃO DE ADESÃO AGREGATIVO (AA) _____	27
FIGURA 6 - ESQUEMA DAS ETAPAS DA PATOGÊNESE DE EAEC EVIDENCIANDO OS FATORES DE VIRULÊNCIA IDENTIFICADOS PRINCIPALMENTE EM EAEC 042. _____	30
FIGURA 7- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1%) DAS PCR PARA OS GENES CLASSIFICATÓRIOS DE EXPEC. _____	50
FIGURA 8- PREVALÊNCIA DOS GENES CLASSIFICATÓRIOS DE EXPEC NAS CEPAS DE EAEC (CASOS E CONTROLES). _____	51
FIGURA 9 - FILOGRUPOS ENCONTRADOS NAS CEPAS DE EAEC E UPEC COM E SEM MARCADOR DE EAEC. _____	63
FIGURA 10- ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS CEPAS DE EAEC E UPEC DESTE ESTUDO. _____	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE ExPEC. _____	17
TABELA 2- SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADOS NESTE ESTUDO PARA DETECÇÃO DOS GENES DE ExPEC. _____	38
TABELA 3- SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADOS NESTE ESTUDO PARA DETECÇÃO DOS GENES DE EAEC. _____	40
TABELA 4- SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADOS NESTE ESTUDO PARA DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS AUTOTRANSPORTADORAS. _____	42
TABELA 5- FLUXOGRAMA DE DETERMINAÇÃO DOS FILOGRUPOS ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE CLERMONT ET AL. (2013). _____	44
TABELA 6- SEQUÊNCIA DOS INICIADORES, TEMPERATURA DE ANELAMENTO E TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NAS REAÇÕES DE PCR QUADRUPLEX PARA CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA. _____	45
TABELA 7- SEQUÊNCIA DOS INICIADORES, TEMPERATURA DE ANELAMENTO E TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NAS REAÇÕES DE PCR COMPLEMENTARES PARA CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DOS GRUPOS C E E. _____	47
TABELA 8- SEQUÊNCIA DOS INICIADORES, TEMPERATURA DE ANELAMENTO E TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA DETERMINAÇÃO DOS SEQUENCE TYPES (ST) DAS CEPAS ESTUDADAS. _____	49
TABELA 9- COMBINAÇÕES DOS GENES NAS CEPAS DE EAEC CLASSIFICADAS COMO ExPEC. _____	52
TABELA 10- PREVALÊNCIA DE GENES DE VIRULÊNCIA CARACTERÍSTICOS DE EAEC NAS AMOSTRAS DESTES ESTUDO. _____	53
TABELA 11- PREVALÊNCIA DE GENES DE PROTEÍNAS AUTOTRANSPORTADORAS NAS CEPAS DE EAEC E UPEC. _____	54
TABELA 12- PERFIL GENÉTICO DE ALGUNS MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE EAEC E UPEC DAS CEPAS DE EAEC COM MARCADORES DE ExPEC ISOLADAS DE CASOS. _____	56
TABELA 13- PERFIL GENÉTICO DE ALGUNS MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE EAEC E UPEC DAS CEPAS DE EAEC COM MARCADORES DE ExPEC ISOLADAS DE CONTROLES. _____	57
TABELA 14- PERFIL GENÉTICO DE ALGUNS MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE EAEC E UPEC DAS CEPAS DE UPEC COM E SEM MARCADORES DE EAEC. _____	58

TABELA 15- CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DAS CEPAS DE EAEC E UPEC DESTE ESTUDO	60
TABELA 16- <i>SEQUENCE TYPES</i> DAS EAEC E UPEC DESTE ESTUDO COM OS RESPECTIVOS PERFIS GENÉTICOS DE CADA CEPA.	65
TABELA 17- GRUPAMENTO DOS ST DE ACORDO COM O PATÓTIPO ESTUDADO.	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
1.2 <i>E. COLI</i> COMO AGENTE DE INFECÇÕES EXTRAINTESTINAIS.....	16
1.3 INFECÇÕES INTESTINAIS	20
1.4 CORRELAÇÃO FILOGENÉTICA ENTRE EAEC E UPEC	32
2 OBJETIVO	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 CEPAS BACTERIANAS.....	35
3.2 CULTIVO DAS CEPAS.....	35
3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (TÉCNICA DE PCR).....	35
3.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	36
3.5 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS AMPLICONS.....	37
3.6 PESQUISA DE GENES MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE EXPEC	37
3.7 PESQUISA DE GENES DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE EAEC E DE PROTEÍNAS AUTOTRANSSPORTADORAS	39
3.8 ANÁLISE DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS	43
3.9 MULTILOCUS SEQUENCING TYPING (MLST).....	48
4 RESULTADOS	50
4.1 PESQUISA DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE EXPEC	50
4.2 PESQUISA DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE EAEC	52
4.3 PESQUISA DE MARCADORES GENÉTICOS DE PROTEÍNAS AUTOTRANSSPORTADORAS	53
4.4 PERFIL GENÉTICO DAS CEPAS DE EAEC E UPEC	54
4.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	59
4.6 MULTILOCUS SEQUENCING TYPING (MLST).....	63
4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA	67
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo assim um micro-organismo bacilar e Gram negativo, não esporulante, anaeróbio facultativo, que coloniza o trato intestinal de animais de sangue quente e de humanos, permanecendo como comensal durante toda a vida do indivíduo (JOHNSON; RUSSO, 2005; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005; TENAILLON et al., 2010).

Esta espécie foi isolada e nomeada primeiramente como *Bacillus coli commune*, sendo posteriormente renomeada *Escherichia coli*. O gênero *Escherichia* é uma homenagem ao pediatra alemão Theodor Escherich, que descreveu esta bactéria em 1885. A espécie *coli* faz referência ao habitat natural deste organismo, ou seja, proveniente do cólon (INGERSON-MAHAD; REID, 2011).

E. coli pertence ao filo *Proteobacteria* localizando-se no grupo das *Gammaproteobacteria*, um dos cinco grupos filogenéticos (alfa, beta, gama, delta e épsilon) que compõem este filo (MADIGAN et al., 2010).

Por ser uma bactéria intestinal, esta espécie é utilizada por órgãos regulatórios como marcador de contaminação fecal no ambiente, principalmente em controles de água potável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; USA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1986).

Embora a maioria das cepas de *E. coli* circulantes sejam comensais e não causem nenhum dano ao hospedeiro, com exceção de pacientes imunocomprometidos e/ou quando a barreira gastrointestinal é rompida, alguns clones de *E. coli* altamente adaptados possuem fatores de virulência variados que lhes conferem a habilidade de colonizar novos sítios e causar um amplo espectro de doenças intestinais e extraintestinais. Estes fatores geralmente são codificados em elementos genéticos móveis, como ilhas de patogenicidade, sequências de inserção ou plasmídeos, e são passíveis de criarem novas combinações de fatores de virulência que podem vir a ser parte integrante do genoma bacteriano, sendo que as combinações de fatores de virulência de caráter mais vantajosos persistem e se

tornam patótipos específicos de *E. coli* (CROXEN; FINLAY, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As cepas de *E. coli* patogênicas são subdivididas primeiramente em dois grandes grupos, as *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e as *E. coli* extraintestinais (ExPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RUSSO; JOHNSON, 2000).

Ao estudar estrutura de populações bacterianas empregando *E. coli* como modelo, Whittam et al. (1983) descreveram uma subestrutura genética em quatro filogrupos denominados A, B1, B2 e D (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012).

Com base nesses dados Clermont et al. (2000) desenvolveram uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para classificar filogeneticamente cepas de *E. coli*, sendo que por este método as cepas virulentas, principalmente cepas de ExPEC, geralmente classificavam-se no filogrupo B2, podendo algumas serem classificadas no filogrupo D. Por outro lado, as cepas comensais e cepas de DEC eram até então mais comumente encontradas nos filogrupos A e B1 (HERZER et al., 1990; LECOINTRE et al., 1998; SABATÉ et al., 2006). Esta abordagem deixou claro que cepas de diversos filogrupos diferem em características fenotípicas e genotípicas, nicho ecológico e habilidade em causar doenças (ALM et al., 2011; TENAILLON et al., 2010).

Porém, posteriores estudos de *multilocus sequence typing* (MLST), outra técnica de filotipagem que se baseia no sequenciamento de genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo bacteriano, demonstraram que pelo método descrito por Clermont et al. (2000), cerca de 20% das cepas não eram corretamente caracterizadas (GORDON et al., 2008).

Tendo isto em vista Clermont et al. (2013) desenvolveram recentemente uma nova técnica de PCR para caracterização filogenética de *E. coli*. Nesta abordagem as cepas podem ser classificadas nos sete filogrupos conhecidos atualmente (filogrupos A, B1, B2, C, D, E e F). Com o uso desta técnica foi possível observar que cepas de ExPEC são mais comumente encontradas nos filogrupos B2, D e F e cepas de DEC e comensais são comumente encontradas nos filogrupos A, B1, C e E. Além dos filogrupos clássicos de *E. coli*, esta técnica permite a identificação de clados de *Escherichia*. Estas cepas pertencem às chamadas linhagens crípticas, e são geneticamente diferentes mas fenotipicamente idênticas a *E. coli* (CLERMONT et al., 2013).

1.2 *E. coli* como agente de infecções extraintestinais

As principais infecções extraintestinais causadas por *E. coli* são as infecções do trato urinário (ITU), as sepses (frequentemente associadas à infecção urinária) e as meningites de recém-nascidos. As cepas causadoras destas doenças são coletivamente denominadas *E. coli* extraintestinais, ou ExPEC (JOHNSON; RUSSO, 2005; PITOUT, 2012; RILEY, 2014).

Apesar de muito estudadas, o mecanismo de disseminação clonal de cepas ExPEC não está totalmente esclarecido (RILEY, 2014). Os fatores de virulência conhecidos em ExPEC são associados principalmente à colonização e capacidade de sobreviver no ambiente. Os genes que codificam esses fatores de virulência são localizados no cromossomo bacteriano, onde usualmente encontram-se em ilhas de patogenicidade, ou em plasmídeos e são separados em cinco grupos principais: adesinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro, produção de cápsula e invasinas (DALE; WOODFORD, 2015). Os principais fatores de virulência encontrados neste grupo bacteriano estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Principais fatores de virulência de ExPEC. Adaptado de Dale e Woodford, 2015.

	Fator de virulência	Gene(s) codificante(s)
Adesinas	Sideróforo de adesão	<i>iha</i>
	Adesina da família Dr	<i>afaA/draBC</i>
	Pilus comum de <i>E. coli</i>	<i>ecpA</i>
	Fímbria F1C	<i>foc</i>
	Hemaglutinina resistente ao calor	<i>hra</i>
	Fímbria M	<i>bmaE</i>
	Fímbria específica N-acetil D-glucosamina	<i>gaf</i>
	Fímbria P	<i>papACEFG</i>
	Fímbria S	<i>sfa/sfaS</i>
	Hemaglutinina sensível ao calor	<i>tsh</i>
	Fímbria tipo 1	<i>fimH</i>
Aquisição de Ferro	Receptor de aerobactina	<i>iutA</i>
	Proteína periplasmática de ligação ao ferro	<i>sitA</i>
	Receptor salmoquelina	<i>iroN</i>
	Receptor sideróforo	<i>ireA</i>
	Receptor yersiniabactina	<i>fyuA</i>
Cápsula	Cápsula do grupo 2	<i>kpsMT II</i>
	Cápsula do grupo 3	<i>kspMT III</i>
	Variante K1/K2/K5 do grupo de cápsula 2	genes K1/K2/K5
Invasão e Evasão	Proteína de conjugação	<i>traT</i>
	Resistência ao soro	<i>iss</i>
	Invasão do endotélio cerebral	<i>ibaA</i>
Toxinas	α -hemolisina	<i>hylD</i>
	Toxina citolética distensora	<i>cdtB</i>
	Fator citotóxico necrosante	<i>cnf1</i>
	Toxina de <i>E. coli</i> enteroagregativa	<i>astA</i>
	Hemolisina A	<i>hyla</i>
	Toxina autotransportadora	<i>sat</i>
	Serino protease	<i>pic</i>
	Toxina vacuolizante	<i>vat</i>

As ITU apresentam alta morbidade, tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, resultando em altos custos econômicos e diminuição da produtividade de trabalho (BRUMBAUGH; MOBLEY, 2012). A grande maioria das ITU (70 a 90%) é causada por *E. coli* uropatogênica (UPEC), a qual reside no trato intestinal em

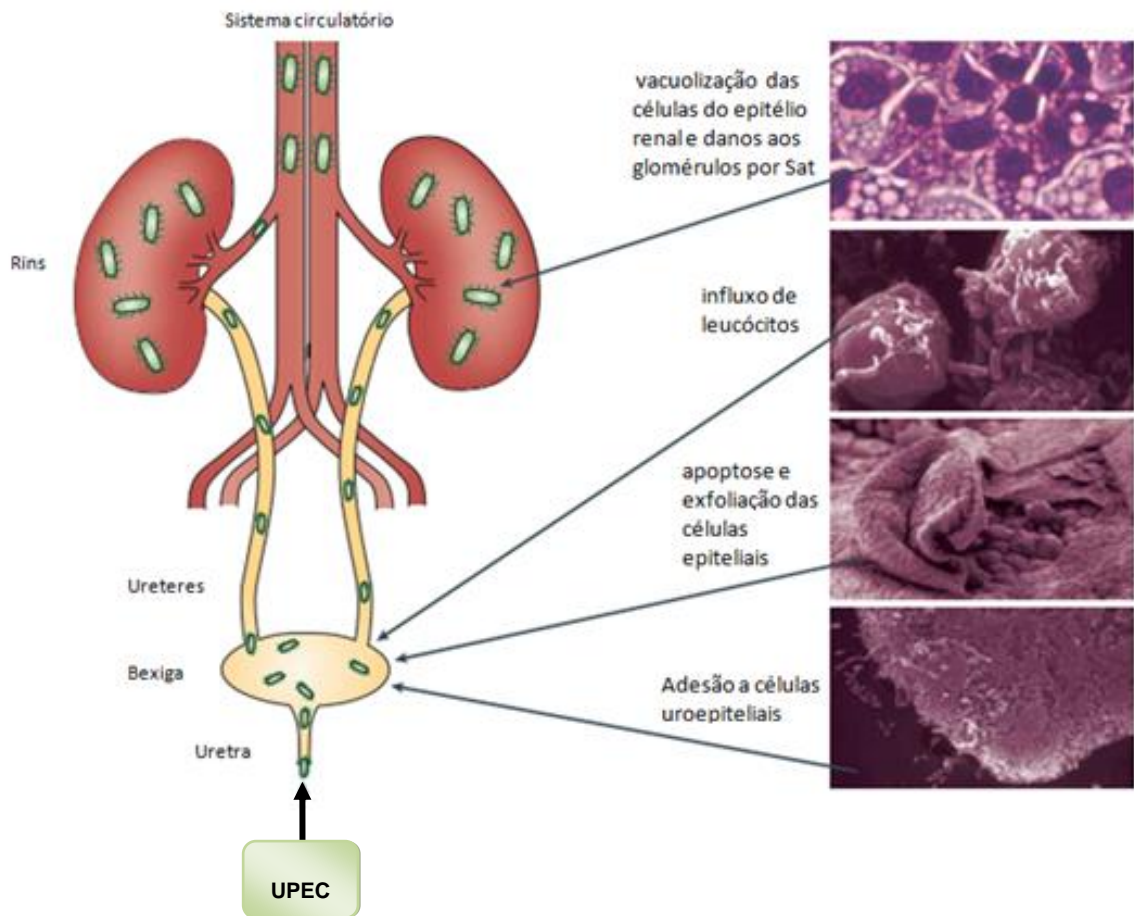
conjunto com as cepas de *E. coli* comensais e patogênicas e ascende à bexiga através da uretra, sendo que por esta via estas cepas também são capazes de causar sepse. O segundo patógeno mais comumente relacionado a ITU é o *Staphylococcus saprophyticus*, seguido de outras espécies como *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012, WANG et al., 2013).

UPEC age como um patógeno intracelular oportunista, sendo capaz de formar comunidades intracelulares, que possuem propriedades parecidas com as de biofilmes, protegendo a bactéria da resposta imune do hospedeiro e propiciando infecções crônicas e recidivas. É capaz de causar diversos tipos de manifestações clínicas, como bacteriúria, cistite e pielonefrite, e estão presentes no intestino de cerca de 20% das pessoas saudáveis (AGARWAL; SRIVASTAVA; SINGH, 2012; DALE; WOODFORD, 2015). Este patótipo é capaz de se evadir do sistema imune pela produção da proteína TraT, uma proteína de membrana externa associada com a resistência à atividade bactericida do soro (HANNAN et al., 2012; ULETT et al., 2013).

As ITU podem ser classificadas em alta ou baixa. A UTI baixa, ou cistite aguda, refere-se à infecção da bexiga; enquanto a infecção alta, ou pielonefrite, refere-se à infecção dos rins. Esta patologia é mais comum em mulheres do que em homens por características anatômicas do trato geniturinário feminino e da presença de substâncias antibacterianas no fluido prostático masculino (FIHN, 2003).

Estas infecções se instalam por via ascendente. As bactérias provenientes do ambiente intestinal ascendem à uretra em direção à bexiga e aos rins (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), conforme ilustrado na Figura 1. Primeiramente acontece a adesão às células uroepiteliais por conta das fímbrias P e do tipo 1. Com a adesão estabelecida ocorre a apoptose e exfoliação das células epiteliais, seguido do influxo de leucócitos polimorfonucleares. Após o estabelecimento da infecção na bexiga, se não tratada, as bactérias podem ascender pelos ureteres e estabelecer a infecção nos rins. Neste estágio ocorre a vacuolização das células do epitélio renal e os danos aos glomérulos por conta da ação da toxina Sat. Neste estágio o tratamento da doença é imprescindível, pois a partir da infecção renal as bactérias podem alcançar o sistema venoso e causar a sepse (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Figura 1- Esquema dos estágios da infecção do trato urinário por UPEC.



Adaptado de Kaper, Nataro e Mobley (2004).

Algumas situações como o uso de cateteres, relações sexuais frequentes, uso constante de espermicida, histórico prévio de ITU, doenças renais, imunodeficiência ou imunossupressão, entre outros, aumentam o risco de desenvolver a ITU. O maior índice de ITU ocorre em mulheres por conta da maior proximidade do canal uretral com o ânus e pelo canal da uretra ser menor em relação ao canal uretral masculino (WANG et al., 2013).

A partir do momento em que as *E. coli* entram em contato com o ambiente venoso são passíveis de causar sepse. Estas cepas, também conhecidas como SEPEC, são as bactérias Gram negativas mais associadas a infecções sanguíneas, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Riley, 2014).

As bacteremias que apresentam mais de 10^3 unidades formadoras de colônias (UFC)/ml de sangue são significativamente mais passíveis de desenvolver

meningite. A translocação da bactéria que está no sangue para o sistema nervoso central ocorre sem danos aparentes na barreira hemato-encefálica (STINS; BADGER; KIM, 2001).

As cepas causadoras de sepse estão também relacionadas as meningites neonatais. Estas cepas são também conhecidas como MNEC e são fatais entre 15-40% dos casos ou causam danos neurológicos severos na maioria dos sobreviventes (DAWSON; EMERSON; BURNS, 1999; UNHANAND et al., 1993).

1.3 Infecções intestinais

E. coli diarreiogênicas, ou DEC, causam infecções intestinais por desregularem as funções normais do intestino, provocando assim a diarreia. Podem causar estes danos de diversas maneiras, de acordo com o seu arcabouço genético de fatores de virulência. Na diarreia induzida por bactérias ocorre a rápida perda de fluidos e eletrólitos, resultado da inibição da absorção normal do intestino, assim como a ativação de processos de secreção (BLASER; DEANE; FRUHWALD, 2015; INGERSON-MAHAD; REID, 2011; VISWANATHAN; HODGES; HECHT, 2008).

A diarreia é um dos maiores problemas mundiais de saúde pública, e causa anualmente a morte de cerca de 1,3 milhões de crianças até cinco anos, principalmente em países em desenvolvimento. Esta patologia também é uma das maiores causas de morte de crianças abaixo de 5 anos de idade no Brasil (BRYCE et al., 2005). Este resultado se dá principalmente pelo fato destes países, concentrados principalmente nos continentes Latinoamericano, Africano e Asiático, possuírem uma ampla população de crianças abaixo de cinco anos e por conta das condições epidemiológicas e socioeconômicas dessas áreas (BLACK et al., 2010).

Repetidas crises diarreicas em crianças contribuem significativamente para deficiências de crescimento e comprometem parte do condicionamento físico, cognição e escolaridade (GUERRANT et al., 2013). Estima-se que diarreias recorrentes nos primeiros dois anos de idade podem contribuir com a perda de 10 pontos no quociente de inteligência (Q.I.) e um ano de escolaridade até os nove anos de idade (KEUSCH et al., 2013; PETRI et al., 2008; WHO, 2015).

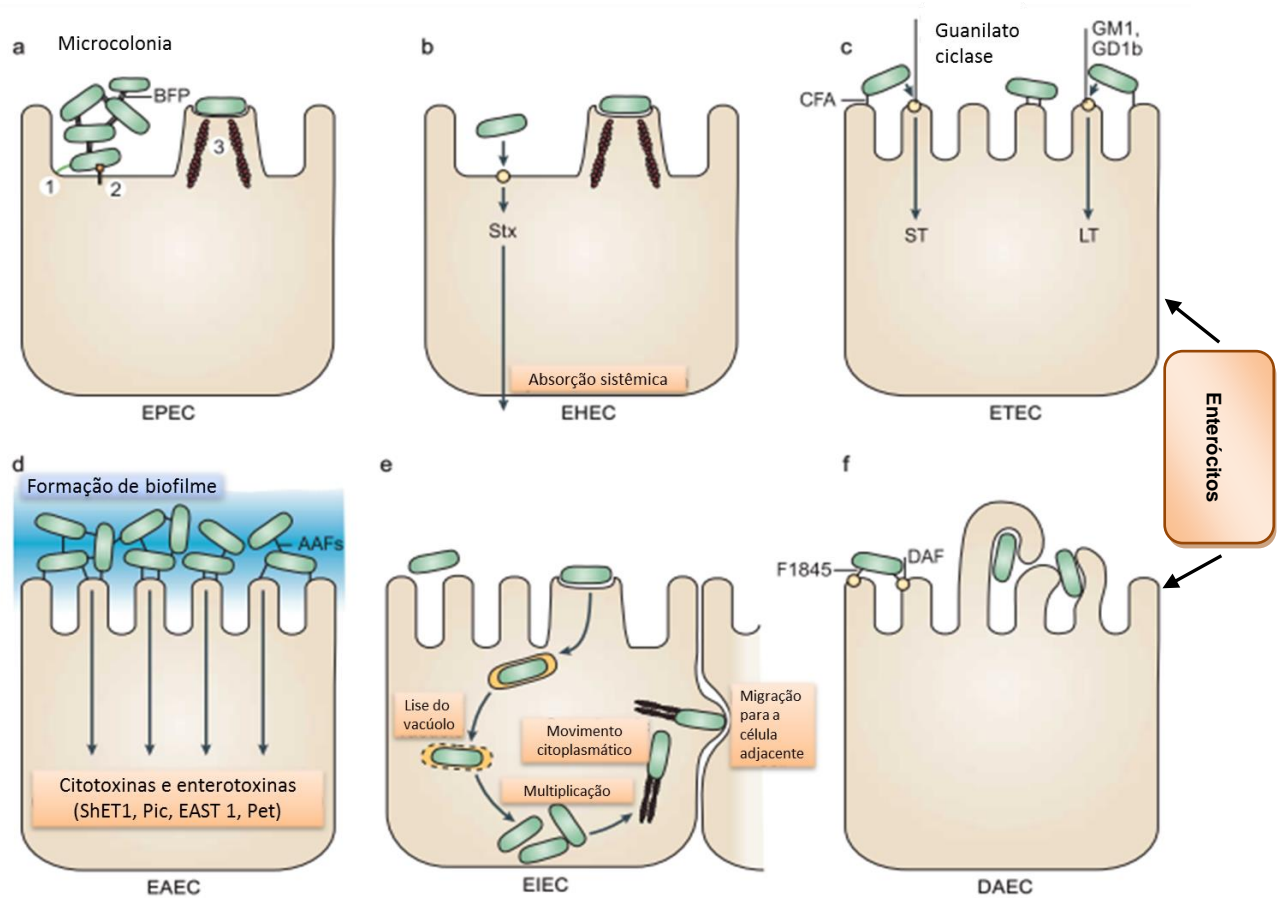
E. coli é o agente etiológico bacteriano mais comum da diarreia endêmica nos países em desenvolvimento, responsáveis por metade dos óbitos associados a essa patologia (LANATA et al., 2013).

Em contraste com outros patógenos entéricos, como *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., o diagnóstico das cepas de DEC no curso da infecção é bastante complexo, isto porque grande parte das cepas causadoras de diarreia são bioquimicamente idênticas às *E. coli* comensais e a diferenciação necessita de infraestrutura laboratorial muito especializada (ESTRADA-GARCIA et al., 2014).

A diversidade patogênica de DEC compreende pelo menos seis categorias ou patótipos, os quais causam infecção intestinal por diferentes mecanismos. Estes patótipos são identificados e classificados de acordo com suas características de virulência, interações com células epiteliais *in vitro* e manifestações clínicas (CROXEN et al., 2013). Esses patótipos são conhecidos como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). O avanço dos conhecimentos de epidemiologia e genética desses patótipos levou à subclassificação de EPEC e EAEC como típicas ou atípicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SARANTUYA et al., 2004) e as EHEC passaram a constituir um subgrupo de STEC, ou *E. coli* produtoras da toxina Shiga (Stx) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A Figura 2 apresenta uma ilustração das principais características de virulência de cada um dos patótipos de DEC, descritos a seguir.

Figura 2- Esquema da patogênese dos seis patótipos de DEC reconhecidos.



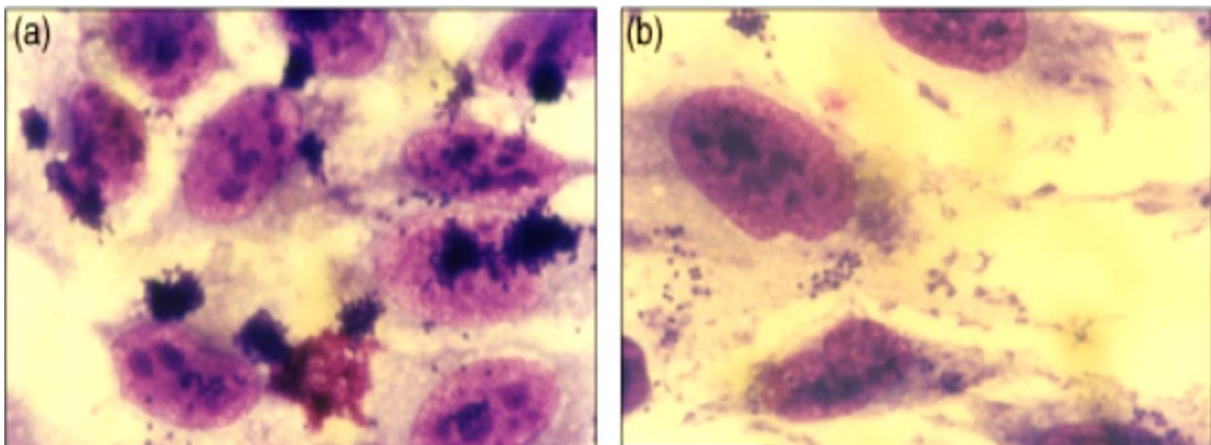
Adaptado de Kaper, Nataro e Mobley (2004).

E. coli enteropatogênica (EPEC) é um importante agente etiológico de diarreia infantil em muitos países por conta de sua alta prevalência na comunidade e em ambientes hospitalares (OCHOA; CONTRERAS, 2011).

Por conta de heterogeneidade genética este patótipo foi subdividido em EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC). Ambos os grupos são capazes de induzir a lesão *attaching-effacing* (lesão A/E) na mucosa intestinal. Essa lesão é caracterizada pela desestruturação das microvilosidades intestinais, forte adesão entre bactéria e enterócito, culminando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal por conta do acúmulo de actina e outros componentes do citoesqueleto da célula eucariótica sob a bactéria aderida (MOON et al., 1983). A principal diferença entre os dois grupos está na presença do plasmídeo pEAF (*EPEC adherence factor*) somente nas amostras de EPEC típicas (KAPER, 1996).

As cepas de tEPEC caracterizam-se pelo padrão de adesão localizada (AL) na superfície de células HeLa ou HEP-2, apresentando-se como microcolônias compactas aderidas às células após três horas de contato. Já as cepas de aEPEC podem apresentar um padrão de aderência semelhante a tEPEC, porém com microcolônias mais frouxas, denominado adesão localizada like (AL-L), o qual pode ser observado após seis horas de contato com as células epiteliais (SCALETSKY et al. 1984; SCALETSKY et al., 1999). A Figura 3 apresenta os padrões AL e AL-L de EPEC em ensaios de adesão com células HeLa .

Figura 3- Padrões de adesão apresentados por cepas de EPEC típica (AL) e atípica (LA-L).



(A) Padrão de adesão localizada (AL); (B) padrão de adesão localizada-like (AL-L). Adaptado de Hernandez et al. (2009).

EHEC é classificada como um sub-grupo de STEC e foi identificada nos Estados Unidos em 1982 como agente de um surto de diarreia sanguinolenta e de síndrome hemolítica urêmica (SHU) (RILEY et al., 1983). As cepas deste patótipo caracterizam-se pela produção da toxina Stx e a capacidade de causar a lesão A/E da mesma forma que cepas de EPEC. As doenças causadas por este patótipo continuam sendo um grande problema de saúde pública em todo o planeta, geralmente associadas a surtos de origem alimentar. As manifestações clínicas da infecção por EHEC incluem a diarreia sanguinolenta, a colite hemorrágica e a SHU, na qual a toxina Stx representa o principal fator de virulência (AMORIM et al., 2014; CROXEN et al., 2013).

Stx pode ser classificada em dois tipos: Stx1 e Stx2, incluindo subtipos e variantes dos subtipos (SHEUTZ, 2014). O principal reservatório destas cepas é o trato intestinal de bovinos, e os surtos causados por elas foram inicialmente associados ao consumo de hambúrgueres mal cozidos. As cepas do sorogrupo O157:H7 são as mais conhecidas, e foram responsáveis por um surto que teve origem em uma rede de lanchonete (CROXEN et al., 2013; INGERSON-MAHAD; REID, 2011; RILEY et al., 1983).

STEC é o patótipo de *E. coli* que produz a toxina Stx, mas que diferente de EPEC não produz lesão A/E. Estas cepas constituem um importante grupo de enteropatógenos e podem causar diarreia aguda, diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica e SHU (CLEMENTS et al., 2012; HUNT, 2010).

Na maior parte do mundo STEC O157:H7 é o sorotipo mais comum a causar doenças, entretanto tornou-se evidente que cepas não O157 também são causas importante de doença em humanos. Os sorogrupos mais relacionados a doenças são conhecidos como “*big six*” e compreendem os sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (BROOKS et al., 2005).

EPEC é o patótipo caracterizado pela produção das toxinas termolábil (LT) e/ou termoestável (ST). Este patótipo é capaz de produzir uma ou ambas as toxinas no curso de uma infecção, a qual causa diarreia aquosa (Kaper; Nataro; Mobley, 2004; LEVINE, 1987). Este é o mais comum agente causador da diarreia do viajante e de diarreia aguda em zonas endêmicas (ISIDEAN et al., 2011).

A toxina LT compreende uma classe de enterotoxinas encontradas predominantemente em isolados humanos e que são intimamente relacionadas tanto em estrutura quanto em função à toxina colérica, secretada por *Vibrio cholerae* (SPANGLER, 1992). A toxina ST compreende duas classes de toxinas não relacionadas: STa e STb, que diferem em estrutura e mecanismo de ação, sendo que somente STa está associada à doença humana (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A toxina LT atua ativando a adenilato ciclase, provocando o aumento da produção de AMP cíclico (cAMP), gerando o aumento da síntese de prostaglandinas e o acúmulo de sal e água no lúmen intestinal, causando assim morte celular e os sintomas da diarreia aquosa (SPANGLER, 1992). Já a toxina ST atua elevando os níveis de GMP cíclico (cGMP), o que leva ao desequilíbrio hidrossalino causado pela

ativação de guanilato ciclase, gerando assim a diarreia aquosa (TURNER et al., 2006).

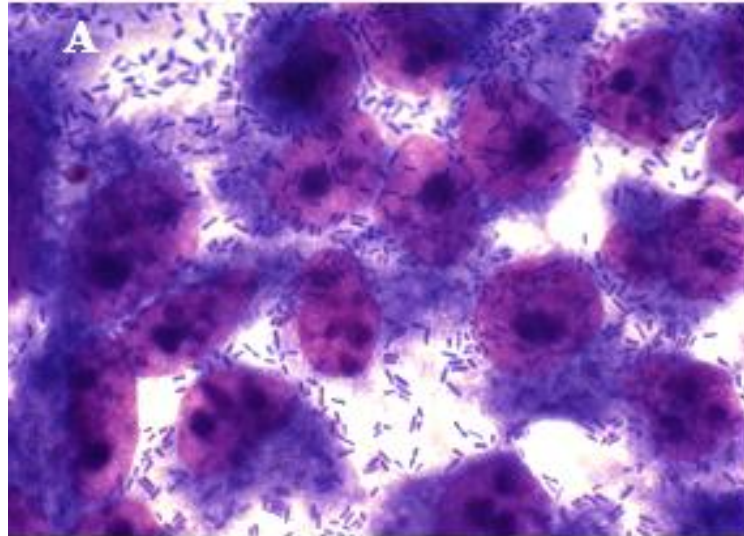
Cepas de EIEC são bioquímica, genética e patogenicamente relacionadas a *Shigella spp.* Estas bactérias são taxonomicamente indistinguíveis no nível de espécie, mas, levando em conta a significância clínica de *Shigella*, a nomenclatura distinta foi mantida. Este patótipo é um patógeno intracelular facultativo e é o agente etiológico da disenteria bacilar (PUPO; LAN; REEVES, 2000; WEI et al., 2003).

EIEC apresenta virulência reduzida quando comparada a *Shigella*, incluindo expressão reduzida dos fatores de virulência, baixa eficiência ao matar macrófagos, baixo índice de espalhamento célula-célula e baixa indução de resposta pró-inflamatória, o que leva a uma doença menos severa (BANDO et al., 2010; MORENO et al., 2009; MORENO et al., 2012). A adaptação de EIEC para se tornar um patógeno intracelular deriva basicamente da aquisição de um plasmídeo de invasão, pINV (CROXEN et al., 2013). As infecções por EIEC são pouco frequentes, mesmo em países subdesenvolvidos (KOTLOFF et al., 2013).

O padrão de adesão a células epiteliais cultivadas, determinado no ensaio de adesão descrito por Cravioto et al. (1979), define os patótipos DAEC e EAEC quando uma cepa de *E. coli* não apresenta os marcadores de virulência dos patótipos EPEC, ETEC, EHEC e EIEC (NATARO; KAPER, 1998).

DAEC é o patótipo que adere a células epiteliais *in vitro* no padrão denominado difuso (AD), onde a bactéria encontra-se aderida de maneira difusa sobre toda a superfície celular (NATARO et al, 1987), conforme evidenciado na Figura 4.

Figura 4- Padrão de adesão difuso (AD)



Padrão de adesão difuso em células HEp-2 infectadas com a cepa C1845 protótipo de DAEC. Fonte: Abreu, 2015.

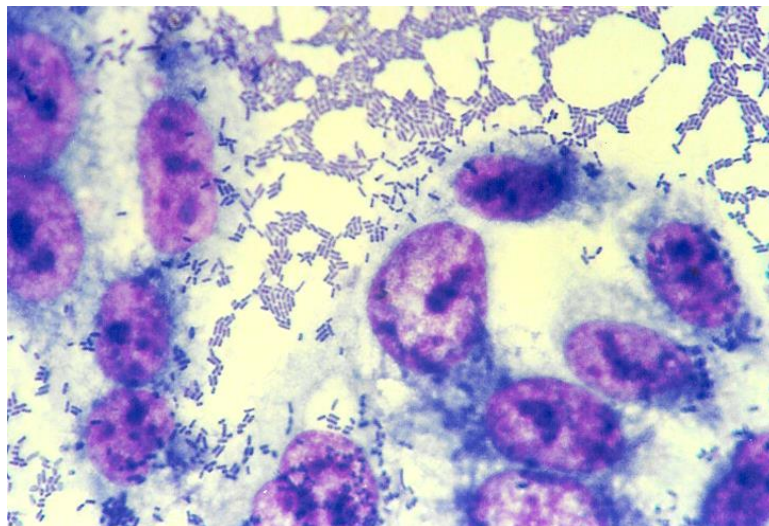
Por conta da dificuldade de identificação e classificação deste patótipo, a designação de DAEC como patógeno entérico requer mais estudos epidemiológicos (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Esta categoria de enteropatógeno é bastante heterogênea e alguns estudos mostram associação de DAEC com diarreia, principalmente quando os grupos estudados são divididos por faixas etárias, sendo mais comum em crianças acima de 1 ano de idade (GIRÓN et al., 1991; SCALETSKY et al., 2002; SNELLING et al., 2009; SPANO et al., 2008). Porém, outros estudos não associam este patótipo à diarreia (GOMES et al., 1998; NATARO et al., 1987; RODRIGUES et al., 2002).

Alguns fatores de virulência já foram identificados em cepas de DAEC, tais como as fímbrias F1845 e AIDA-I, entretanto o mecanismo como DAEC causa a diarreia não foi estabelecido (BENZ; SCHMIDT, 1992; BILGE et al., 1989). O contato entre a cepa protótipo de DAEC C1845 com células HEp-2 induz a formação de projeções eucarióticas onde as bactérias permanecem aderidas (COOKSON; NATARO, 1996). Esse fenótipo pode ter um papel importante na sobrevivência e patogênese de DAEC, entretanto não foi investigado em outras cepas desse patótipo. É desconhecida a maneira de como DAEC é transmitida e qual o seu

principal reservatório (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SERVIN, 2014).

EAEC é definida como o patótipo de *E. coli* que adere a células epiteliais cultivadas apresentando o padrão agregativo (AA), conforme ilustrado na Figura 5. A descrição deste padrão ocorreu durante a análise da capacidade de aderência a células HEp-2 de cepas de *E. coli* isoladas de um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda no Chile (NATARO et al., 1987). Neste padrão de adesão as bactérias encontram-se aderidas umas às outras, à superfície celular e também à lamínula na ausência de células, numa organização semelhante a tijolos empilhados, formando agregados ou cordões. A partir de então foi definido um novo patótipo de DEC, inicialmente denominado EAggEC e posteriormente EAEC (NATARO et al., 1987).

Figura 5- Padrão de adesão agregativo (AA)



Padrão de adesão agregativo em células HEp-2 infectadas com a cepa 042 protótipo de EAEC. Fonte: Elias, 1999.

Desde a sua descrição EAEC vem sendo identificada ao redor do mundo e é associada à infecção intestinal aguda e persistente em crianças onde é endêmica, ou seja, em países subdesenvolvidos (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Além disso tem sido também identificada como agente de diarreia aguda em países

desenvolvidos afetando tanto crianças como adultos (CHATTAWAY et al., 2014; DALLMAN et al., 2014; NATARO et al., 2006). Este patótipo também é relacionado à diarreia persistente em paciente imunocomprometidos, como portadores do vírus HIV e é associado à diarreia do viajante (CROXEN et al., 2013; HARRINGTON et al., 2006; HUANG et al., 2006).

Crianças e adultos que vivem em países em desenvolvimento, assim como turistas que visitam estes países, são susceptíveis a infecções por EAEC, as quais podem resultar em quadros de diarreia persistente (OKHUYSEN; DUPONT, 2010). Além de casos isolados, já foram descritos diversos surtos de diarreia causados por EAEC veiculados por alimentos (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; HARADA et al., 2007; HARRINGTON et al., 2006; HUANG et al., 2006; ITOH et al., 1997; SMITH; CHEASTY; ROWE, 1997).

Em 2011 uma cepa de EAEC produtora da toxina Stx (híbrido EAEC/STEC) causou um grande surto de origem alimentar na Alemanha, o qual afetou cerca de 4000 indivíduos e levou a morte 50 pacientes adultos (RASKO et al., 2011).

Uma característica importante deste patótipo reside no fato de que um número considerável de pacientes pode ser colonizado de forma assintomática, permanecendo em um estado de inflamação intestinal persistente, o que nos leva a acreditar que a manifestação da doença gastrointestinal depende da cepa e de fatores do hospedeiro (STEINER et al., 2000). Esse estado de colonização, além de manter essas cepas diarreiogênicas circulando na comunidade, tem consequências no desenvolvimento físico e cognitivo da criança (OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

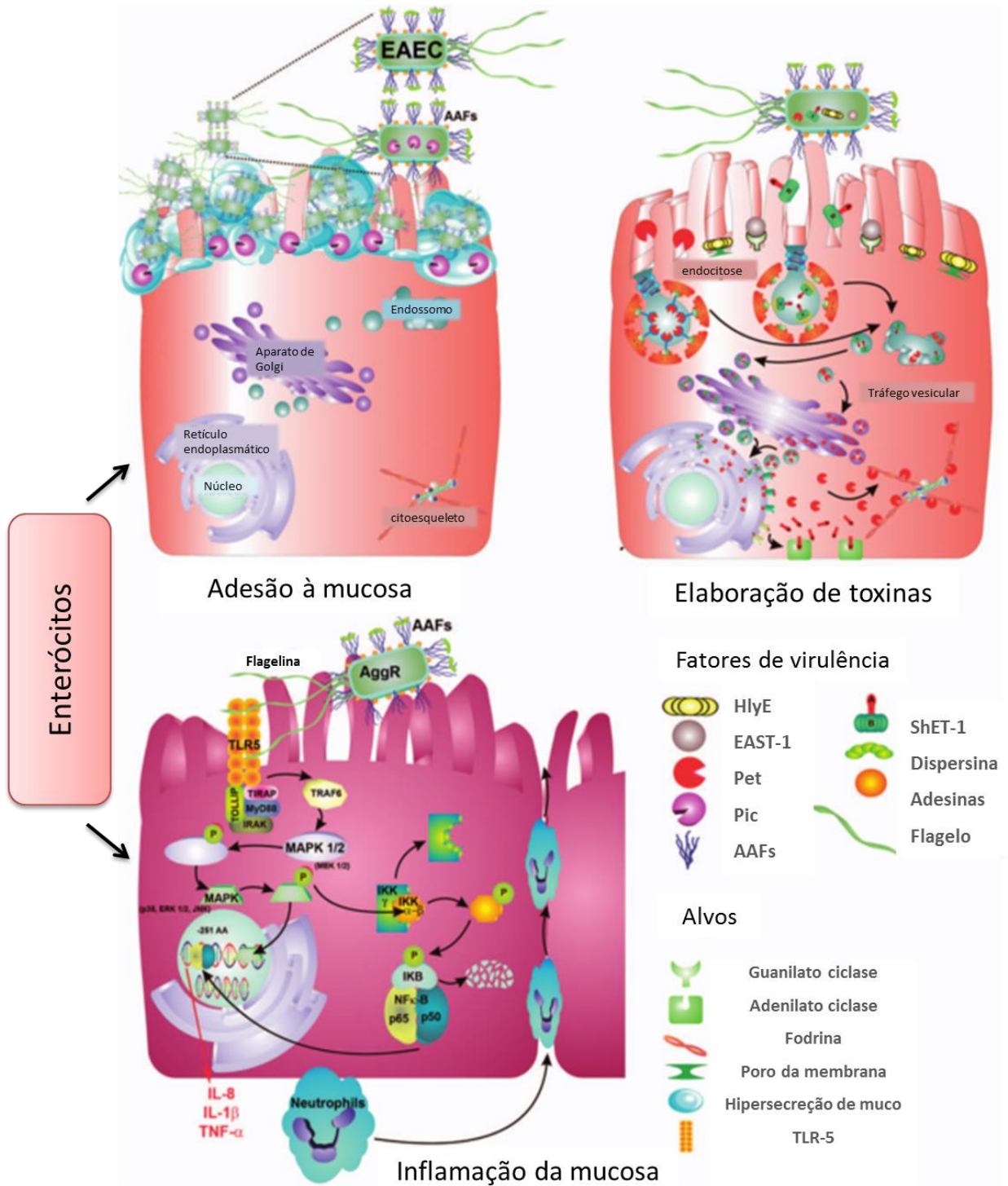
Apesar de EAEC ser encontrada e identificada em todas as regiões do mundo e ser considerada um patógeno emergente, a patogênese de EAEC é menos conhecida em comparação aos outros patótipos de DEC (HARRINGTON et al., 2006; HUANG et al., 2006).

A adesão à mucosa é um passo essencial na colonização e na produção da doença causada por EAEC. O padrão AA também é observado na mucosa intestinal infectada, onde a aderência é caracterizada como um biofilme composto por agregados de bactéria em associação com a camada mucosa. O teste de adesão em células HeLa ou HEP-2 é utilizado como diagnóstico padrão ouro para classificação de EAEC (HICKS et al., 1996; NATARO; KAPER, 1998; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; TZIPORI et al., 1992).

Baudry et al. (1990) desenvolveram uma sonda genética para o diagnóstico de EAEC, sendo esta denominada CDV432, a qual na época correspondia a um fragmento crítico de 1 kb do plasmídeo de virulência presente na cepa 17-2, uma cepa padrão de EAEC. Nishi et al. (2003), demonstraram que a sonda CVD432 na realidade correspondia ao gene *aatA*, o qual faz parte do sistema ABC de secreção, sendo assim a sonda passou a ser denominada corretamente de sonda *aatA*.

As três principais características da patogênese de EAEC são: aderência abundante na mucosa intestinal e formação de biofilme na superfície do enterócito; produção de enterotoxinas e citotoxinas; indução da inflamação da mucosa, secreção intestinal e danos às células epiteliais (ESTRADA-GARCIA et al., 2014; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). A Figura 6 apresenta essas três etapas da patogênese de EAEC indicando os principais fatores de virulência envolvidos em cada etapa. Cabe salientar que esse modelo é baseado nos diversos fatores identificados na cepa protótipo 042 (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Figura 6 - Esquema das etapas da patogênese de EAEC evidenciando os fatores de virulência identificados principalmente em EAEC 042.



Adaptado de Navarro-Garcia e Elias (2011).

A cepa de EAEC 042 (O44:H18) é usada como protótipo para o estudo deste patótipo, porém as numerosas adesinas, toxinas e proteínas envolvidas na patogênese desta bactéria são muito variáveis entre os isolados (CROXEN et al., 2010). Até o presente momento nenhum fator de virulência específico foi encontrado em todas as cepas de EAEC (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012).

Sarantuya et al. (2004) propuseram a classificação de EAEC em grupos de típica e atípica, de acordo com a presença ou não do gene *aggR*, o qual codifica uma proteína reguladora global dos genes de virulência de EAEC e está localizado no plasmídeo de virulência comumente presente em cepas deste patótipo (BAUDRY et al., 1990).

Vários fatores de virulência têm sido descritos em cepas de EAEC, e um dos fatores de maior impacto são as estruturas fimbriais conhecidas como fímbrias de adesão agregativa (AAFs). Estas fímbrias, junto à adesinas não fimbriais, atuam no primeiro estágio da patogênese, a aderência à mucosa intestinal. Os genes que codificam estas adesinas são sempre encontrados em baixa prevalência, o que indica a alta diversidade de estruturas adesivas responsáveis pelo padrão AA (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Cinco variantes da fímbria AAF foram até agora descritas: AAF/I, II, III, IV e V; sendo todas elas reguladas pelo ativador transcricional AggR, um regulador positivo pertencente à família AraC de reguladores. Estas fímbrias são relacionadas às adesinas da família Dr, as quais requerem proteínas chaperonas para sua biogênese. Além disto, as fímbrias da família Dr estão relacionadas também a cepas de UPEC, que comumente expressam adesinas Afa (CROXEN et al., 2011; JØNSSON et al., 2015; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Outra característica de EAEC é a habilidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, resultado da agregação bacteriana (SHEIK et al., 2001).

Uma importante classe de toxinas produzidas por EAEC são as chamadas proteínas autotransportadoras. As proteínas autotransportadoras são proteínas de membrana externa que consistem de um amplo domínio N-terminal extracelular (domínio passageiro) e um domínio C-terminal que consiste em um domínio β -barril (domínio β). Este domínio foi originalmente proposto com a função de um canal de transporte para seu próprio domínio passageiro pela membrana externa (BERNSTEIN, 2007; HENDERSON et al., 2004). Inicialmente duas proteínas autotransportadoras foram identificadas em EAEC, Pet e Pic (ESLAVA et al., 1998;

HENDERSON et al., 1999), as quais fazem parte do grupo das SPATE, ou *serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae* (DAUTIN, 2010). As SPATE compreendem serino proteases com funções diversas, tais como proteases, toxinas e adesinas (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

No segundo estágio de infecção por EAEC ocorre a secreção de toxinas. Os efeitos dessas toxinas incluem vesiculação das microvilosidades, aumento das aberturas das criptas e aumento da extrusão celular. Estas toxinas incluem Pet, uma toxina que altera o citoesqueleto; EAST-1, uma enterotoxina termoestável; ShET1, uma toxina que induz o AMP cíclico celular (cAMP); e Pic, uma proteína que possui atividade mucinolítica e mucinogênica. Uma toxina não caracterizada identificada no genoma de EAEC inclui uma potencial hemolisina codificada pelo gene *hlyE*, assim como a dispersina, uma proteína com ação anti-agregante codificada pelo gene *aap*. Apesar das diversas toxinas associadas a este patótipo, nenhum fator de virulência é associado a EAEC de forma comum a todas as cepas (CROXEN et al., 2011; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

No último estágio de infecção de EAEC muitos fatores influenciam a severidade da inflamação, incluindo a virulência da cepa e a resposta imune do hospedeiro. Durante a infecção por EAEC ocorre o recrutamento de neutrófilos, o que estimula a diarreia inflamatória (CROXEN et al., 2011).

1.4 Correlação filogenética entre EAEC e UPEC

Em um estudo realizado por Abe et al. (2008) cepas de UPEC foram analisadas quanto à presença de marcadores genéticos de DEC, mostrando que algumas cepas de UPEC albergavam algumas propriedades de virulência dos patótipos intestinais, principalmente associados a EAEC, como Pet, Pic, dispersina, AAF/I, EAST-1 e AggR. Esses achados indicam claramente que algumas cepas fecais de EAEC podem apresentar potencial uropatogênico, e que certas UPEC podem ter adquirido propriedades de EAEC, tornando-se potenciais causadoras de diarreia.

Posteriormente Olesen et al. (2012) relataram um surto de ITU causado por uma EAEC do sorotipo O78:H10, corroborando os dados de Abe et al. (2008). Este surto ocorreu em 1991, na cidade de Copenhague, Dinamarca. Um total de 18 pacientes adquiriu ITU, a qual foi causada por uma cepa pertencente ao *sequence*

type (ST) 10, grupo filogenético A (CLERMONT et al., 2013), multirresistente, pertencente ao sorotipo O78:H10. A origem desta cepa causadora do surto não foi identificada. Esta foi a primeira vez que EAEC estava relacionada com um surto relacionado à doença extraintestinal.

Em 2013 o mesmo grupo de investigadores (BOLL et al., 2013) determinou as propriedades uropatogênicas desta cepa O78:H10 e mostraram que estas propriedades são conferidas por fatores de virulência específicos de EAEC. Neste estudo foi demonstrado que os fatores de virulência, até então específicos de EAEC, como a expressão da fímbria AAF/I, aumentam a uropatogenicidade e podem ter tido um importante papel na habilidade da cepa causar o surto de ITU, já que nenhuma das cepas isoladas deste surto apresentavam fatores de adesão típicos de ExPEC, como fímbria P, fímbria S/F1C e adesinas da família Dr. Além da expressão de AggR e AAF/I, outros fatores de virulência comumente encontrados em EAEC, como a Sat e Pic, podem ter contribuído para a uropatogenicidade.

Poucos estudos têm investigado a prevalência de fatores de virulência típicos de EAEC em cepas causadoras de infecções extraintestinais, entretando, cepas de EAEC com marcadores de UPEC são encontradas com uma prevalência relativamente alta em coleções de isolados de ITU (ABE et al., 2008; NAZEMI et al., 2011; OLESEN et al., 2012; PARK et al., 2009; WALLACE-GADSDEN et al., 2007). Todos esses relatos indicam que algumas cepas de EAEC que colonizam o trato intestinal têm potencial de colonização e infecção do trato urinário.

Sendo assim, torna-se relevante caracterizar coleções de EAEC isoladas tanto de pacientes com diarreia como de controles assintomáticos, quanto à presença de marcadores de virulência de ExPEC, com o objetivo de detectar a presença de cepas com características de UPEC e provável potencial uropatogênico. De que forma este grupo de EAEC com características específicas se relaciona geneticamente com cepas isoladas de ITU, ou seja UPEC com ou sem marcadores de virulência de EAEC, ainda é uma questão a ser esclarecida.

2 OBJETIVO

Analisar as relações filogenéticas entre cepas de EAEC que apresentam marcadores genéticos de ExPEC e cepas de UPEC com e sem marcadores genéticos de EAEC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Para realização deste estudo foi selecionada uma coleção de 92 cepas EAEC isoladas a partir de um estudo epidemiológico sobre a etiologia da doença diarreica na infância realizado na cidade de São Paulo. Deste total, 46 foram isoladas de casos de diarreia e 46 de controles assintomáticos (GOMES et al., 1998). Essas cepas foram previamente classificadas como EAEC através da detecção do padrão AA em células HeLa e caracterizadas quanto à prevalência de alguns genes de virulência de EAEC (ELIAS et al., 2002; GOMES et al., 1998). Além das cepas de EAEC, foram também utilizadas 18 cepas de UPEC como grupo comparativo, as quais foram isoladas de pacientes apresentando infecção do trato urinário (ABE et al., 2008). Dentre elas, oito apresentam marcadores de virulência de EAEC, ou seja, apresentam padrão AA de adesão em células HeLa e/ou reatividade com a sonda de diagnóstico de EAEC (gene *aatA*) e dez cepas não apresentam nenhum dos marcadores moleculares de EAEC (ABE et al., 2008).

3.2 Cultivo das cepas

O cultivo das cepas foi realizado em caldo ou ágar Luria Bertani (LB) durante 18 horas a 37 °C em ambiente estático. Após inoculação em caldo as culturas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar MacConkey (MC) para verificação de pureza da cultura, sendo que estas placas foram então mantidas em estufa a 37 °C por 16 a 18 horas para obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas obtidas a partir desta cultura foram cultivadas novamente em ágar ou caldo LB para obtenção de lisado bacteriano ou DNA genômico quando necessário.

3.3 Reação em cadeia da Polimerase (técnica de PCR)

Para cada reação de PCR foram utilizados: 20 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), 2 mM de MgCl₂, 5 µl do tampão de reação de PCR 10X (Invitrogen), 0,2

mM da mistura de dNTPs (Invitrogen), 5 µl do lisado bacteriano das cepas e água milliQ estéril para um volume final de 25 µl. As reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Waltham, MA, EUA) ou termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, HH, Alemanha)

A cepa de *E. coli* DH5α foi usada como controle negativo em todas as amplificações (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As cepas usadas como controles positivos estão descritas nas tabelas 2, 3 e 4.

Os lisados bacterianos usados como DNA molde para as reações foram obtidos a partir de uma colônia isolada em placa de ágar LB, a qual foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 500 µl de água MilliQ estéril. Esta mistura foi então ressuspensa e submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo. Após a obtenção, os lisados bacterianos foram acondicionados em freezer à -20 °C. Além dos lisados bacterianos foi utilizado também DNA genômico como DNA molde das reações. Para obtenção de DNA genômico foi utilizado o *kit* de extração Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Fitchburg, WI, EUA) conforme recomendações do fabricante. Os produtos obtidos a partir da amplificação gênica foram analisados através de eletroforese em gel de agarose.

3.4 Eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados fundindo-se agarose (Invitrogen) em tampão TAE 1x (40 mM tris-acetato; EDTA 1mM) na concentração final de 0,8%, 1% ou 2%, dependendo do tamanho esperado dos fragmentos de DNA, e então corados com solução *GelRed Nucleic Acid Stain* (Biotium, Hayward, CA, EUA) na concentração de 1:5000.

Os produtos amplificados das PCRs foram acrescidos de tampão de corrida *loading buffer* 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%). Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1 kb DNA Ladder, 100 bp DNA ladder (Fermentas, Waltham, MA, EUA) ou 50 pb DNA ladder (Invitrogen), conforme indicado. Após a corrida eletroforética, realizada sob corrente elétrica de 70 V/cm em tampão TAE 1x, os géis foram observados em transiluminador de luz ultravioleta UVP (Upland, San Leandro, CA, EUA) e fotografados com o auxílio de sistema de imagem Alphaimager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA).

3.5 Sequenciamento e análise dos amplicons

Alguns dos amplicons obtidos por PCR foram sequenciados. Para isso, após a amplificação foram purificados com auxílio do GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification *kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra), de acordo com instruções do fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram quantificados a partir de eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando como padrão de concentração de DNA o marcador de massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). O sequenciamento foi realizado no Laboratório do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, utilizando o sequenciador automático Applied Biosystems 3500 (Applied Biosystem). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante em volume final de 10 µl, utilizando 150 pmol do amplicon purificado, iniciadores específicos e o BigDye® terminator v3.1 cycle sequencing kit. As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas com auxílio do software BioEdit e foram comparadas no banco de dados do Pubmed através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.6 Pesquisa de genes marcadores de virulência de ExPEC

A pesquisa dos genes que classificam uma cepa como ExPEC (*papA*, *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* e *kpsMT II*) foi realizada de acordo com Johnson et al. (2003), tanto para as cepas de UPEC quanto para as cepas de EAEC utilizadas no estudo. A técnica foi realizada conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4, utilizando os iniciadores e condições descritas na tabela 2. Por esta metodologia uma cepa é considerada uma ExPEC se apresentar pelo menos dois dos 6 genes pesquisados, considerando *papA* e *papC* em conjunto, ou seja, apenas quando os dois genes são detectados (JOHNSON et al., 2003).

Tabela 2- Sequência dos iniciadores e ciclos de amplificação utilizados neste estudo para detecção dos genes de ExPEC.

Gene	Iniciadores	Função	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência	Controle positivo ^a
<i>papA</i>	(F) ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG (R) CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	Adesina da fímbria P	62	720	JOHNSON et al., 2003	<i>E. coli</i> J96
<i>papC</i>	(F) GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA (R) ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	<i>Usher</i> da fímbria P	62	200	JOHNSON et al., 2003	<i>E. coli</i> J96
<i>sfa/foc</i>	(F) CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC (R) CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	Fímbria S e F1C	62	410	JOHNSON et al., 2003	<i>E. coli</i> RS218
<i>afa/dra</i>	(F) GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC (R) CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	Operons de adesinas da família Dr (AFA I-III, Dr, F1845)	62	559	JOHNSON et al., 2003	<i>E. coli</i> A30
<i>iutA</i>	(F) GGCTGGACATCATGGGAACTGG (R) CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	Síntese e receptor de aerobactinas (sideróforo)	62	300	JOHNSON et al., 2003	<i>Shigella flexneri</i> SA101
<i>kpsMT II</i>	(F) GCGCATTGCTGATACTGTTG (R) CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	Síntese de polissacarídeo capsular Grupo II (K1, K5, K12)	62	272	JOHNSON et al., 2003	<i>E. coli</i> Ec040

(F) iniciador *forward*; (R) iniciador *reverse*.

^a Cepas empregadas como controles positivos: *E. coli* J96, *E. coli* RS218, *Shigella flexneri* SA101 e *E. coli* Ec040 (SANTOS et al., 2013).

3.7 Pesquisa de genes de marcadores de virulência de EAEC e de proteínas autotransportadoras

Além da detecção dos genes que classificam uma cepa como ExPEC, a técnica de PCR foi utilizada para a detecção dos seguintes genes de virulência de EAEC: *pilS*, *pilV*, *agg3A*, *agg3C*, *virK*, *rfaU*, *agg4A*, *agg4C*, *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*; bem como para a detecção de genes que codificam as seguintes proteínas autotransportadoras: *sat*, *sigA*, *espC*, *espP*, *epeA*, *espI* e *sepA* (ABREU et al., 2013; BOISEN et al., 2009; BOISEN et al., 2012; CZECHULIN et al., 1999; RESTIERI et al., 2007; SCHMIDT et al., 2001). Esta análise foi realizada tanto em cepas EAEC quanto em cepas UPEC pela técnica de PCR conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4, utilizando os iniciadores e condições descritas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3- Sequência dos iniciadores e ciclos de amplificação utilizados neste estudo para detecção dos genes de EAEC.

Gene	Iniciadores	Função	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência	Controle positivo ^a
<i>pilS</i>	(F) ATGAGCGTCATAACCTGTTC (R) CTGTTGGTTTCCAGTTTGAT	Estrutura da fímbria Pil	50	534	DUDLEY et al., 2006a	EAEC C1096
<i>pilV</i>	(F) GGATCCATGCAAAAAGACAACGATAA (R) AAGCTTTTAATTGAGCGTTACACACG	Adesina da fímbria Pil	50	1.194	DUDLEY et al., 2006a	EAEC C1096
<i>agg3A</i>	(F) GGTAACAAGGGAAATATTAGC (R) GCCCGAAAAATGTCCAGTAT	Adesina da fímbria AAF/III	60	462	BERNIER et al., 2002	<i>E. coli</i> A30
<i>agg3C</i>	(F) GTTTGGAACCGGGAATTAACATTG (R) ATACTTTAGATACCCCTCACGCAG	Usher da fímbria AAF/III	65	485	BERNIER et al., 2002	<i>E. coli</i> A30
<i>virK</i>	(F) ATGTTTTCTATAAGTAACTTATCATTATCGG (R) TTAATTTGAATTCTGATGTTCTGAG	Chaperona da toxina Pet	55	951	CZECZULIN et al., 1999	EAEC 042
<i>rfbU</i>	(F) ATGAATATACTATTTACGGAATC (R) CTACAGGCACAGAAAATGCCGATG	Biossíntese de lipopolissacarídeo	55	822	CZECZULIN et al., 1999	EAEC 042
<i>agg4C</i>	(F) ATATGTTTAATCGGTTCTTTA (R) ACCATCTGATTCTAATACCGT	Usher da fímbria AAF/IV	55	1.000	BOISEN et al., 2008	EAEC BA1116
<i>agg4A</i>	(F) TGAGTTGTGGGGCTAYCTGGA (R) CACCATAAGCCGCCAAATAAGC	Adesina da fímbria AAF/IV	57	169	BOISEN et al., 2008	EAEC BA1116
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTCAGGATTGCCATTAG	Sistema de secreção do tipo VI	56	476	DUDLEY et al., 2006b	EAEC 042
<i>aaiG</i>	(F) GGGAGTGTTTCAGTCTGGAC (R) ATTTGTCAACAAGCTCAGCAT	Sistema de secreção do tipo VI	56	782	DUDLEY et al., 2006b	EAEC 042
<i>aaiC</i>	(F) AAAAATCTAGATGTCAAATAGAGATATAGGT (R) TATATATCTAGAAACAACCTTAAATGATGAG	Sistema de secreção do tipo VI	53	278	DUDLEY et al., 2006b	EAEC 042

<i>aaiU</i>	(F) CAGACAGGAAGCATGGGTTC (R) CAGGCATGTCAAACCTCAAGA	Sistema de secreção do tipo VI	54	806	DUDLEY et al., 2006b	EAEC 042
-------------	---	-----------------------------------	----	-----	-------------------------	----------

(F) iniciador forward; (R) iniciador reverse.

^a Cepas empregadas como controles positivos: EAEC C1096 (Cobeljić et al., 1996), *E. coli* A30 (Santos et al., 2014), EAEC 042 (Nataro et al., 1985) e EAEC BA1116 (Bueris et al., 2007).

Tabela 4- Sequência dos iniciadores e ciclos de amplificação utilizados neste estudo para detecção de genes que codificam proteínas autotransportadoras.

Gene	Iniciadores	Função	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência	Controle positivo ^a
<i>sat</i>	(F) TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG (R) CCATTATCACCCAGTAAAACGCACC	Toxina autotransportadora de UPEC/DAEC	59	930	ABREU et al., 2013	DAEC FBC114
<i>sigA</i>	(F) CCGACTTCTCACTTTCTCCCG (R) CCATCCAGCTGCATAGTGTGTTG	Toxina da família SPATE ^b	58	430	BOISEN et al., 2009	<i>S. flexneri</i> 2a
<i>espC</i>	(F) TAGTGCAGTGCAGAAAGCAGTT (R) AGTTTTCTGTTGCTGTATGCC	Atividade enterotoxigênica e clivagem de espectrina, pepsin e fator V	55	301	ABREU et al., 2013	EPEC E2348/69
<i>espP</i>	(F) GTCCATGCAGGGACATGCCA (R) TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	Clivagem de espectrina, pepsina e fator V	55	547	ABREU et al., 2013	EHEC EDL933
<i>epeA</i>	(F) GGGAGAGTTCAGGCATTTA (R) CAGCGTTACCTTACTTGAG	Protease e atividade mucinolítica	57	783	ABREU et al., 2013	EHEC EH41
<i>espl</i>	(F) ATGGACAGAGTGGAGACAG (R) GCCACCTTTATTCTCACCA	Degradação de proteínas do plasma	52	560	ABREU et al., 2013	STEC O113:H21
<i>sepA</i>	(F) GCAGTGGAAATATGATGCGGC (R) TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	Toxina da família SPATE	58	794	BOISEN et al., 2009	<i>S. flexneri</i> 2a

(F) iniciador *forward*; (R) iniciador *reverse*.

^a Cepas empregadas como controles positivos: DAEC FBC114, *Shigella flexneri* 2a, EPEC E2348/69, EHEC EDL933, EHEC EH41 e STEC O113:H21 (ABREU et al., 2013).

^b SPATE, *serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae*.

3.8 Análise dos grupos filogenéticos

As cepas de EAEC classificadas como ExPEC segundo o critério de Johnson et al. (2003), bem como todas as UPEC selecionadas, foram analisadas quanto à classificação filogenética de acordo com a metodologia descrita por Clermont et al. (2013). Esta metodologia é baseada inicialmente em uma PCR quadruplex, seguida de PCRs complementares dependendo do resultado obtido nessa primeira análise. A tipagem permite classificar uma *E. coli* em um dos sete grupos filogenéticos distintos: A, B1, B2, C, D, E ou F. O fluxograma de tipagem através desta metodologia está representado na tabela 5.

Tabela 5- Fluxograma de determinação dos filogrupos através da metodologia de Clermont et al. (2013).

<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2	Filogrupo	Próximo passo
+	-	-	-	A	-
+	-	-	+	B1	-
-	+	-	-	F	-
-	+	+	-	B2	-
-	+	+	+	B2	-
-	+	-	+	B2	Pode ser confirmado testando o gene <i>ibeA</i> ^a
+	-	+	-	A ou C	Confirmar utilizando iniciadores específicos para C
+	+	-	-	D ou E	Confirmar utilizando iniciadores específicos para E
+	+	-	+	D ou E	Confirmar utilizando iniciadores específicos para E
-	+	+	-	E ou clado I	Confirmar utilizando iniciadores específicos para E e clados de <i>E. coli</i> ^b
-	-	+	-	Clado I ou II	Confirmar utilizando iniciadores específicos para os clados de <i>E. coli</i> ^b
-	(+) ^c	-	-	Clado III, IV ou V	Confirmar utilizando iniciadores específicos para os clados de <i>E. coli</i> ^b
-	-	-	+	Desconhecido	Realizar MLST
-	-	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
+	-	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
+	+	+	+	Desconhecido	Realizar MLST

^a Segundo Gordon et al. (2008).^b Segundo Clermont et al. (2011).^c A reação irá resultar em um amplicon de 476 pb, correspondente a cepas pertencentes aos clados III, IV ou V. A confirmação deve ser feita utilizando iniciadores específicos para os clados de *E. coli* (CLERMONT et al., 2011).

Para cada reação de quadruplex PCR foram utilizados: 20 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), com exceção do iniciador *reverse* para o gene *arpA*, o qual é utilizado a uma concentração de 40 pmol, 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), 2 mM de MgCl₂, 5 µl do tampão de reação de PCR 10X (Invitrogen), 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen), 1 µl do DNA genômico bacteriano das cepas e água milliQ estéril para um volume final de 25 µl. As reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Waltham, MA, EUA) ou termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, HH, Alemanha) e os produtos amplificados foram analisados conforme descrito no item 3.4., utilizando os iniciadores e condições descritas na tabela 6.

Tabela 6- Sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR quadruplex para classificação filogenética.

Gene	Função	Iniciadores	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)
<i>chuA</i>	Sideróforo	(F) ATGGTACCGGACGAACCAAC (R) TGCCGCCAGTACCAAAGACA	59°C	288
<i>yjaA</i>	Desconhecida	(F) CAAACGTGAAGTGTCAGGAG (R) AATGCGTTCCTCAACCTGTG		211
TspE4C2	Gene lipase-esterase	(F) CACTATTCGTAAGGTCATCC (R) AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		152
<i>arpA</i>	Proteína reguladora <i>ankyrin-like</i>	(F) AACGCTATTCGCCAGCTTGC (R) TCTCCCATACCGTACGCTA		400

Em seguida, baseado no genótipo obtido nessa primeira PCR, o isolado é imediatamente inserido em um dos filogrupos ou a classificação segue para uma segunda etapa, que consiste em PCRs complementares (Tabela 7). Em todas as reações o gene *trpA* é utilizado como controle interno da reação. Estas PCRs complementares foram realizadas da seguinte forma: 20 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), com exceção dos iniciadores de controle interno *trpA*, os quais são utilizados a uma concentração de 12 pmol por reação, 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), 2 mM de MgCl₂, 5 µl do tampão de

reação de PCR 10X (Invitrogen), 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen), 1 µl do DNA genômico bacteriano das cepas e água milliQ estéril para um volume final de 25 µl. As reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Waltham, MA, EUA) ou termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, HH, Alemanha) e os produtos amplificados foram analisados conforme descrito no item 3.4. Os iniciadores e condição de amplificação estão descritas na tabela 7.

Tabela 7- Sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR complementares para classificação filogenética dos grupos C e E.

Reação	Gene	Função	Iniciadores	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)
Grupo E	<i>arpA</i>	Proteína reguladora <i>ankyrin-like</i>	(F) GATTCCATCTTGTCAAATATGCC (R) GAAAAGAAAAAGAATTCCAAGAG	57	301
Grupo C	<i>trpA</i>	Síntese de triptofano	(F) AGTTTTATGCCAGTGCGAG (R) TCTGCGCCGGTCACGCC	59	219
Controle interno	<i>trpA</i>	Síntese de triptofano	(F) CGGCGATAAAGACATCTTCAC (R) GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	59	489

3.9 Multilocus sequencing typing (MLST)

As mesmas cepas de EAEC e UPEC selecionadas para a classificação filogenética por Clermont et al. (2013) foram analisadas por MLST, segundo a metodologia descrita por Wirth et al. (2006). Esta metodologia consiste na amplificação por PCR dos seguintes genes que codificam proteínas metabólicas constitutivas: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA*.

Estas PCRs foram realizadas conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4, utilizando os iniciadores e condições descritos na tabela 8, conforme previamente descrito por Wirth et al. (2006) e seguindo as recomendações apresentadas no sítio “MLST databases at UoW” da Universidade de Warwick (Reino Unido), disponível em: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>.

Os produtos de amplificação foram purificados e sequenciados seguindo a descrição no item 3.5. Após amplificação e análise, as sequências de cada cepa foram submetidas no mesmo sítio da Universidade de Warwick para obtenção do Sequencing Type (ST) de cada uma das cepas analisadas, seguindo as instruções da página de acesso.

Em seguida, as sequências parciais dos genes foram concatenadas e exportadas para o programa MEGA (versão 6.0) para a inferência da árvore filogenética. A distância genética entre as cepas foi obtida pelo método Kimura-2 parâmetros e o filograma foi construído através do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas.

Tabela 8- Sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR para determinação dos sequence types (ST) das cepas estudadas.

Gene	Função	Iniciadores	Anelamento (°C)	Amplicon (pb)
<i>adk</i>	Adenilato quinase	(F) TCATCATCTGCACTTTCCGC (R) CCAGATCAGCGCGAACTTCA	54	583
<i>fumC</i>	Fumarato hidratase	(F) TCACAGGTCGCCAGCGCTTC (R) TCCCGGCAGATAAGCTGTGG	54	806
<i>gyrB</i>	DNA gyrase	(F) TCGGCGACACGGATGACGGC (R) GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	60	911
<i>icd</i>	Isocitrato/isopropilmalato deidrogenase	(F) ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA (R) GGACGCAGCAGGATCTGTT	54	878
<i>mdh</i>	Malato deidrogenase	(F) AGCGCGTTCTGTTCAAATGC (R) AGGTTCAGAACTCTCTCTGT	60	932
<i>purA</i>	Adelinosucinato deidrogenase	(F) TCGGTAACGGTGTGCTG (R) CATACGGTAAGCCACGCAGA	54	816
<i>recA</i>	Motivo de ligação ATP/GTP	(F) CGCATTGCTTTACCCTGACC (R) TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	58	780

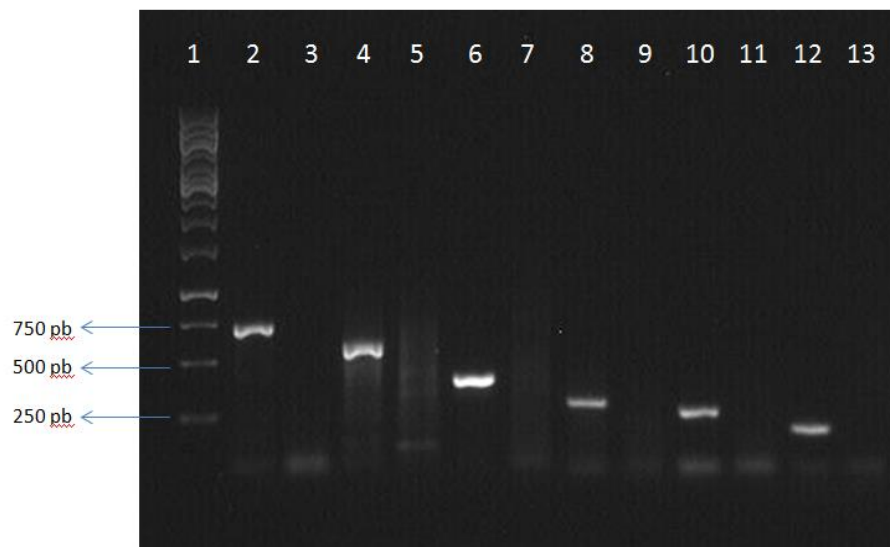
4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa de marcadores de virulência de ExPEC

Na primeira etapa deste trabalho as 92 cepas de EAEC foram submetidas à classificação na categoria de ExPEC, de acordo com os critérios propostos por Johnson et al. (2003). De acordo com esta metodologia a cepa pode ser considerada uma ExPEC se apresentar pelo menos dois dos seguintes genes: *papA* e *papC* (considerados em conjunto), *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* e *kpsMT II*.

A PCR para cada um dos genes foi padronizada de acordo com os controles positivos e negativos padrões descritos no trabalho de Johnson et al. (2003). Na figura 7 podemos observar o gel de agarose com os amplicons correspondentes a cada gene pesquisado por este método. Originalmente a metodologia descrita por Johnson refere-se à de uma multiplex-PCR, porém neste estudo foram realizadas reações separadas para detecção de cada gene.

Figura 7- Eletroforese em gel de agarose (1%) das PCR para os genes classificatórios de ExPEC.

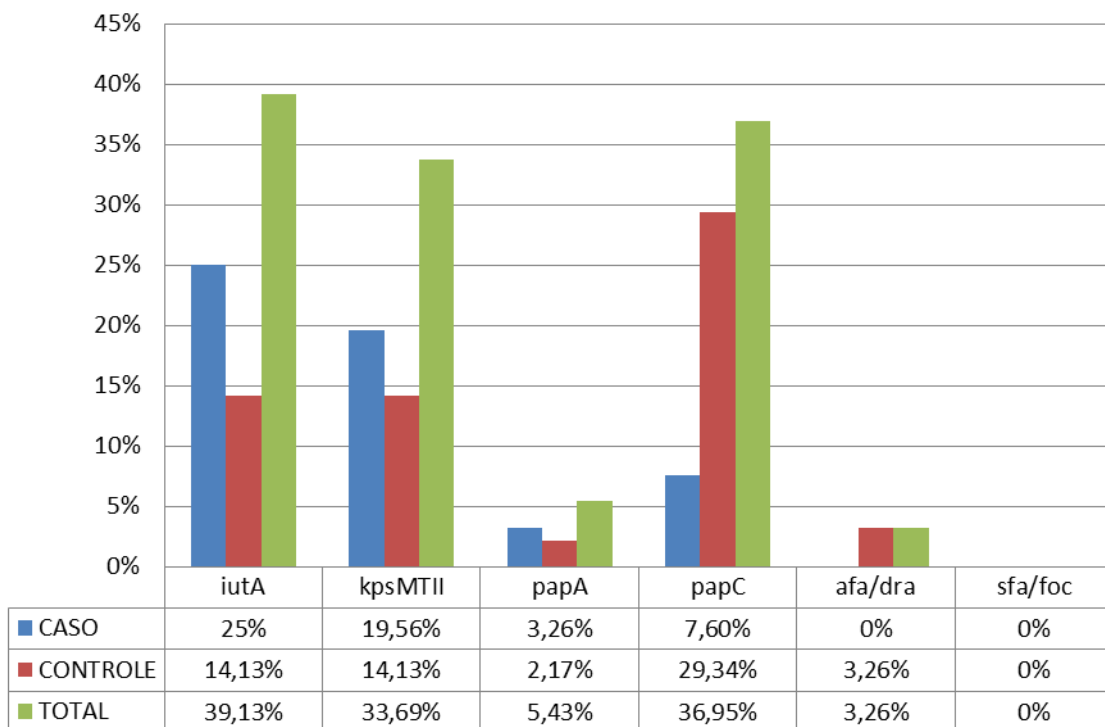


Canaletas: (1) 1 kb ladder (Invitrogen); (2) controle positivo para o gene *papA* - 717 pb (J96); (3) controle negativo para o gene *papA* (DH5 α); (4) controle positivo para o gene *afa/dra* - 594 pb (A30); (5) controle negativo para o gene *afa/dra* (DH5 α); (6) controle positivo para o gene *sfa/foc* - 410 pb

(RS218); (7) controle negativo para o gene *sfa/foc* (DH5 α); (8) controle positivo para o gene *iutA* - 302 pb (A30); (9) controle negativo para o gene *iutA* (DH5 α); (10) controle positivo para o gene *kpsMT II* - 272 pb (Ec-040); (11) controle negativo para o gene *kpsMT II* (DH5 α); (12) controle positivo para o gene *papC* - 205 pb (J96); e (13) controle negativo para o gene *papC* (DH5 α).

A partir dos resultados da PCR para os genes classificatórios de ExPEC foi possível verificar a prevalência destes genes na coleção de EAEC (casos e controles), conforme apresentado na figura 8. Considerando o total de cepas sem distinção quanto à origem, os genes *iutA* (36 cepas), *papC* (35 cepas) e *kpsMT II* (31 cepas) foram os mais prevalentes. Em contrapartida, os genes *papA* (6 cepas) e *afa/dra* (2 cepas) foram pouco frequentes e o gene *sfa/foc* não foi detectado em nenhuma cepa analisada. Quando analisados separadamente com relação à origem, os genes *iutA* (25%) e *kpsMT II* (19,56%) foram mais frequentes em cepas isoladas de casos e o gene *papC* (29,34%) nas cepas isoladas de controles saudios.

Figura 8- Prevalência dos genes classificatórios de ExPEC nas cepas de EAEC (casos e controles).



Do total de 92 cepas de EAEC, 30 (32,6%) foram positivas para ao menos dois dos genes classificatórios, sendo então consideradas cepas ExPEC. Dentre esse total, 18 foram isoladas de casos e 12 de controles. Foi possível observar sete combinações genéticas possíveis a partir destes resultados (Tabela 9), sendo que a combinação *iutA* e *kpsMT II* foi a mais frequente em cepas isoladas a partir de casos e *iutA*, *kpsMT II* e *papC* a mais frequente em cepas isoladas a partir de controles.

Tabela 9- Combinações dos genes nas cepas de EAEC classificadas como ExPEC.

Combinações de genes detectados	Nº (%) de cepas positivas		
	Casos (n=18)	Controles (n=12)	Total (n=30)
<i>papA papC afa/dra</i>	-	1 (8,33)	1 (3,33)
<i>iutA kpsMT II papA papC</i>	1 (5,55)	1 (8,33)	2 (6,66)
<i>iutA kpsMT II papC</i>	3 (16,66)	8 (66,66)	11 (36,66)
<i>iutA kpsMT II</i>	13 (72,22)	2 (16,66)	15 (50)
<i>kpsMT II papA papC</i>	1 (5,55)	-	1 (5,55)
<i>kpsMT II afa/dra</i>	-	1 (8,33)	1 (8,33)
<i>kpsMT II afa/dra papC</i>	-	1 (8,33)	1 (8,33)

Tendo em vista estes resultados, selecionamos as 30 cepas de EAEC que foram consideradas ExPEC por esta metodologia para as análises de determinação de perfil genético de marcadores de virulência e filogenéticas pela metodologia descrita por Clermont et al. (2013) e MLST.

4.2 Pesquisa de marcadores de virulência de EAEC

Tendo selecionado as 30 cepas de EAEC que compuseram as próximas etapas do projeto, foi verificado por PCR, tanto nas cepas de EAEC quanto nas cepas de UPEC (com e sem marcadores de EAEC), a presença dos seguintes marcadores de virulência de EAEC para complementação dos dados destas cepas previamente descritos em Elias et al. (2002) e Abe et al. (2008): *pilS*, *pilV*, *agg3A*, *agg3C*, *virK*, *rfbU*, *agg4A*, *agg4C*, *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*. A tabela 10 mostra a ocorrência desses genes nas cepas de EAEC classificadas como ExPEC e UPEC (com e sem marcador de virulência de EAEC).

Tabela 10- Prevalência de genes de virulência característicos de EAEC nas amostras deste estudo.

Genes	Nº (%) de cepas positivas	
	EAEC (n=30)	UPEC (n=18)
<i>pilS</i>	14(46,66)	1 (5,55)
<i>pilV</i>	14 (46,66)	2 (11,11)
<i>aag3A</i>	9 (30)	-
<i>agg3C</i>	1 (3,33)	-
<i>virK</i>	24 (80)	2 (11,11)
<i>rfbU</i>	10 (33,33)	2 (11,11)
<i>agg4A</i>	1 (3,33)	-
<i>agg4C</i>	3 (10)	-
<i>aaiA</i>	12 (40)	1 (5,55)
<i>aaiC</i>	13 (43,33)	1 (5,55)
<i>aaiG</i>	9 (30)	1 (5,55)
<i>aaiU</i>	1 (3,33)	1 (5,55)

Estes dados nos mostram de forma clara que os genes *pilS*, *pilV*, *virK*, *rfbU*, *aaiA*, *aaiC* e *aaiG* foram mais frequentes nas cepas de EAEC. Os genes *agg3A*, *agg3C*, *agg4A* e *agg4C* não foram encontrados nas cepas de UPEC.

4.3 Pesquisa de marcadores genéticos de proteínas autotransportadoras

Como última análise do perfil genético das cepas de EAEC e UPEC selecionadas para estudo, foi analisada a presença de genes que codificam proteínas autotransportadoras (tabela 11).

Tanto nas cepas de EAEC (caso e controle) quanto nas cepas de UPEC o gene *sat* foi o de maior prevalência, totalizando 5 cepas positivas para este gene em cada grupo estudado. Em contrapartida os genes de menor prevalência foram *espI* e *sepA*, ambos presentes em somente uma cepa de EAEC isolada de caso. Em UPEC todos os genes foram detectados em baixa frequência, considerando o pequeno número de cepas analisadas, sendo que os genes *espI* e *sepA* não foram encontrados neste grupo. Os genes *espC*, *espP* e *epeA* não foram encontrados em nenhuma cepa, tanto de EAEC quanto de UPEC.

Tabela 11- Prevalência de genes de proteínas autotransportadoras nas cepas de EAEC e UPEC.

Genes	Nº (%) de cepas positivas	
	EAEC (n=30)	UPEC [n=18]
<i>sat</i>	10 (33,33)	5 (27,7)
<i>sigA</i>	1 (5,55)	3 (16,66)
<i>espC</i>	-	-
<i>espP</i>	-	-
<i>epeA</i>	-	-
<i>espl</i>	1 (5,55)	-
<i>sepA</i>	1 (5,55)	-

4.4 Perfil genético das cepas de EAEC e UPEC

Os genes que codificam marcadores de virulência de EAEC e proteínas autotransportadoras detectados nas cepas de EAEC deste estudo (tabelas 10 e 11) foram analisados em conjunto com o perfil genético (genes *aatA*, *aafA*, *aafC*, *aggA*, *aggC*, *aggR*, *aap*, *astA*, *shf*, *irp2*, *pet* e *pic*) e padrões de adesão em células HeLa determinados em estudos anteriores (ELIAS et al., 1999; ELIAS et al., 2002; GOMES et al., 1998). Os perfis genéticos de dessas cepas encontram-se descritos nas tabelas 12 e 13, separando as cepas quanto à origem em casos e controles, respectivamente.

Nestas tabelas podemos observar que não houve muita diferença entre as cepas de EAEC caso e controle, sendo que a maioria das cepas de ambos os grupos apresentou perfil genético complexo.

Ao analisar esses dois grupos de cepas em conjunto nota-se que a maioria (24/80%) delas pôde ser classificada como EAEC típica, ou seja, albergavam os genes *aatA/aggR*. Com relação às fímbrias de EAEC pesquisadas, 28 (93,33%) possuíam pelo menos um gene associado, sendo que 19 (63,33%) do total apresentaram genes relacionados à fímbria AAF/III, 5 (16,66%) à fímbria AAF/IV, 4 (13,33%) à AAF/I e 21 (70%) à fímbria Pil. Além disso, com relação aos genes que codificam proteínas autotransportadoras presentes em UPEC, 10 (33,33%) cepas apresentaram o gene *sat* e 7 (23,33%) o gene *pic*. Os demais marcadores

detectados não são exclusivos de EAEC, sendo estes detectados em outros patótipos e outras espécies bacterianas.

Com relação às cepas de UPEC, os mesmos genes analisados nas cepas de EAEC foram detectados neste estudo (tabelas 10 e 11) e analisados em conjunto com os dados de fatores de virulência e de padrões de adesão em células HeLa determinados previamente (ABE et al., 2008). Os perfis genéticos referentes às cepas de UPEC (com e sem marcadores de EAEC) encontram-se na tabela 14.

Ao analisar os dados apresentados na tabela 14 pode-se observar que as cepas de UPEC possuem baixa complexidade quanto à diversidade genética considerando os genes pesquisados neste trabalho.

Ao analisar separadamente os dois grupos de cepas nota-se que os perfis foram bastante distintos, embora o número de cepas analisadas tenha sido pequeno. Nas cepas sem marcadores de EAEC (negativas para sonda *aatA* e/ou adesão AA), não foram detectados os genes codificantes para fímbrias de EAEC, enquanto 5 (50%) cepas albergavam o gene *sat* e 2 (20%) *pic*. Em relação às cepas com marcadores de EAEC (positivas para a sonda *aatA* e/ou adesão AA), 3 (37,50%) possuíam pelo menos um gene associado às fímbrias de EAEC AAF/I, AAF/III e Pil. Estas mesmas cepas apresentaram também o gene *sat*. Da mesma forma dos dados encontrados nas cepas de EAEC, os demais genes pesquisados não são específicos, ou seja, são encontrados em outros patótipos.

Tabela 12- Perfil genético de alguns marcadores de virulência de EAEC e UPEC das cepas de EAEC com marcadores de ExPEC isoladas de casos.

Cepa	Adesão ^a	Perfil genético de EAEC ^b	Perfil genético de ExPEC ^c
41-2	CD	<i>aatA, aggR, astA, aap, shf, aggA, aggC, agg4C, virK, rfbU, aaiACGU, pilS, pilV, sat</i>	<i>iutA, kpsMT II, papA, papC</i>
231-1	AA	<i>aaiA, aaiC, virK, rfbU, agg3C, sat</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
301-1	AA	<i>aatA, aggR, aap, shf, virK, rfbU, agg4A, agg4C, aaiA, aaiG</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
421-4	CD	<i>aatA, aggR, aap, irp2, pic, virK, agg3A, agg3C, aaiA, aaiC</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
591-1	CD	<i>aatA, aggR, astA, aap, aggA, aggC, virK, rfbU, sat, sigA, aaiC, pilS</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
601-1	AA	<i>aatA, aggR, astA, aap, irp2, shf, virK, rfbU, agg3A, agg3C, agg4C, pilS, pilV, sigA, aaiC, pet, pic</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
631-1	AA	<i>aatA, aggR, aap, irp2, aggC, virK, pilV</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
641-1	AA	<i>aatA, aggR, aap, irp2, pilS, virK, agg3C</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
671-2	AA	<i>agg3C</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
851-10	AA	<i>aatA, aggR, aap, irp2, espl, virK, rfbU, agg3C</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
1031-4	AA	<i>aatA, aggR, aap, shf, pic, irp2, virK, sat, sepA, aaiACG, pilS, pet</i>	<i>iutA, kpsMTI II</i>
1261-1	AA	<i>astA, aap, virK, pilS, aaiC</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
2051-1	AA	<i>aatA, aggR, aap, shf, irp2, virK, agg3C</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
2341-1	AA	<i>irp2, virK, pilS</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
2451-3	AA	<i>aatA, aap, irp2, pilS, pilV</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
2701-1	AA	<i>astA, aap, irp2, virK</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
2731-4	AA	<i>aatA, astA, aap, irp2, agg3C, pilV</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
3291-7	CD	<i>aatA, aaiC, virK, sat</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>

^a Ensaios de adesão em células HeLa. CD, cepas citodestacantes, ou seja, a camada celular se desprende da lamínula por alguma ação da bactéria; AA, padrão de adesão agregativo. Dados extraídos de Gomes et al. (1998).

^b Os resultados da presença dos genes *aatA, aggR, aafA, aafC, aggA, aggC, shf, astA, aap, irp2, pet* e *pic* nessas cepas foram extraídos de Elias et al. (1999a) e Elias et al. (2002).

^c Marcadores de ExPEC segundo metodologia descrita por Johnson et al. (2003).

Tabela 13- Perfil genético de alguns marcadores de virulência de EAEC e UPEC das cepas de EAEC com marcadores de ExPEC isoladas de controles.

Cepa	Adesão ^a	Perfil genético de EAEC ^b	Perfil genético de ExPEC ^c
672-4	AA	<i>aatA, aggR, aap, shf, aggA, aggC, irp2, virK, agg3C, sat, aaiAC, pilS, pilV</i>	<i>papA, papC, afa/dra</i>
3122-1	CD	<i>aatA, aggR, aap, shf, pic, irp2, rfbU, agg3A, agg3C, sat, aaiACGU, pilV</i>	<i>iutA, kpsMT II, papA, papC</i>
3202-4	AA	<i>aatA, astA, aap, irp2, virK, agg3A, agg3C, aaiCG</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
3682-2	AA	<i>aatA, aggR, aap, irp2, agg3A, agg3C, aaiACG, pilV, pic</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
3942-2	AA	<i>aatA, aggR, astA, aap, irp2, shf^d, virK, rfbU, agg3A, agg3C, agg4A, pilV</i> <i>aaiAG, pet, pic</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
4052-1	AA	<i>sigA, aaiA, aaiG, agg3A, agg3C, agg4A, virK, pilV, sat</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
4212-6	AA	<i>aatA, astA, aap, irp2, virK, agg3C, pilS, pilV, sat aaiA</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
4332-1	AA	<i>astA, virK, rfbU, pilS, pilV aaiA</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
4692-10	AA	<i>aaiC, aaiG, virK, rfbU, agg3C, pilS, pilV</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>
4792-1	AA	<i>aatA, aggR, aap, espl, irp2, virK, agg3C, pilV, sat</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
4862-1	AA	<i>aatA, aggR, pheU, astA, aspU, shf, irp2, pilS, pilV, pic, pet, virK, agg3A,</i> <i>agg3C</i>	<i>iutA, kpsMT II</i>
4942-1	AA	<i>aatA, aap, pheU, astA, irp2, agg3C, pilS, pilV</i>	<i>iutA, kpsMT II, papC</i>

^a Ensaio de adesão em células HeLa. AA, padrão de adesão agregativa; CD, cepas citodestacantes, ou seja, a camada celular se desprende da lamínula por alguma ação da bactéria. Dados extraídos de Gomes et al. (1998).

^b Os resultados da presença dos genes *aatA, aggR, aafA, aafC, aggA, aggC, shf, astA, aap, irp2, pet* e *pic* nessas cepas foram extraídos de Elias et al. (1999a) e Elias et al. (2002).

^c Marcadores de ExPEC segundo metodologia descrita por Johnson et al. (2003).

Tabela 14- Perfil genético de alguns marcadores de virulência de EAEC e UPEC das cepas de UPEC com e sem marcadores de EAEC.

	Cepa	Adesão ^a	Perfil genético de EAEC ^b	Perfil genético de ExPEC ^c
Cepas sem marcadores de EAEC	1	NA	<i>irp2, sat</i>	<i>papA, papC, kpsMT II</i>
	3	CD	<i>irp2</i>	<i>papA, papC, sfa/foc, kpsMT II</i>
	5	CD	<i>sat</i>	<i>sfa/foc, kpsMTII, iutA</i>
	11	NC	<i>shf, irp2, virK, sat</i>	<i>papA, papC, kpsMT II, iutA</i>
	12	CD	<i>rfaU</i>	<i>sfa/foc, kpsMT II</i>
	15	NC	<i>irp2</i>	<i>papA, papC, kpsMT II</i>
	16	NC	<i>pic, irp2, sat</i>	<i>papA, papC, sfa/foc, kpsMT II, iutA</i>
	21	NC	<i>irp2</i>	<i>papA, papC, kpsMT II, iutA</i>
	28	NC	<i>irp2</i>	<i>papA, papC, kpsMT II</i>
	38	CD	<i>pic, irp2, sat</i>	<i>papA, papC, sfa/foc, kpsMT II, iutA</i>
Cepas com marcadores de EAEC	34	AA	<i>agg3C, shf, irp2, virK, rfaU, sat</i>	<i>afa/dra, iutA, kpsMT II</i>
	35	NA	<i>aatA, aggA, aggC, irp2, sat</i>	<i>papA, papC, kpsMT II, iutA</i>
	46	AA	<i>aatA, aap, astA, pet, irp2</i>	
	216	NA	<i>aatA, aap, astA, shf, irp2, sigA</i>	
	231	AA	<i>astA, irp2, sigA</i>	
	237	AA		
	240	AA	<i>astA, sigA</i>	
	268	CD	<i>aatA, aggR, aggA, aggC, aap, pic, irp2, pilS, pilV, aaiACGU, sat</i>	<i>papA, papC, kpsMT II, sfa/foc, iutA</i>

^a Ensaio de adesão em células HeLa. NA, cepas não aderentes; CD, cepas citodestacantes, ou seja, a camada celular se desprende da lamínula por alguma ação da bactéria; NC, padrão de adesão não característico ou indefinido; AA, padrão de adesão agregativa. Dados extraídos de Abe et al. (2008).

^b Os resultados da presença dos genes *aatA, aggR, aggA, agg3C, shf, astA, aap, irp2, pilS, pet* e *pic* nessas cepas foram extraídos de Abe et al. (2008).

^c Marcadores de ExPEC segundo metodologia descrita por Johnson et al. (2003).

Com os dados presentes na tabela 14 podemos observar que dentre as cepas de UPEC com e sem marcadores de EAEC há diferenças principalmente em relação a quantidade de genes característicos de EAEC, os quais são mais presentes nas cepas com marcador de EAEC. Estas cepas também possuem poucos genes marcadores de ExPEC e possuem, em sua maioria, padrão de adesão agergativo, o qual não é presente nas cepas de UPEC sem marcadores de EAEC

4.5 Análise filogenética

As cepas de EAEC e UPEC selecionadas para continuidade dos experimentos foram submetidas à classificação filogenética por quadruplex PCR de acordo com o descrito por Clermont et al. (2013).

A partir dos resultados obtidos, as cepas puderam ser classificadas nos filogrupos A, B1, B2, C, D, E ou F. O filogrupo A foi composto por 16 cepas de EAEC e 3 de UPEC, sendo 2 delas com marcador e 1 sem marcador de EAEC; o filogrupo B1 foi composto de 2 cepas de EAEC e 1 de UPEC com marcador de EAEC; o filogrupo B2 foi composto de 3 cepas de EAEC e 8 de UPEC sem marcador de EAEC; o filogrupo D foi composto de 6 cepas EAEC e 2 UPEC, sendo 1 com marcador e 1 sem marcador de EAEC; o filogrupo E foi compsto de 1 EAEC e 4 UPEC, sendo 1 sem e 4 com marcador de EAEC e o filogrupo F apresentou 1 cepa de EAEC. Uma cepa do grupo das EAEC não pôde ser classificada em nenhum filogrupo por esta metodologia considerando o seu perfil de amplificação na quadruplex PCR.

A composição de cada um dos filogrupos, apresentando as cepas com seus perfis genéticos de virulência, está apresentada na tabela 15.

Tabela 15- Classificação filogenética das cepas de EAEC e UPEC deste estudo

Filogrupo	Patótipo	Cepas (perfil genético)
A	EAEC	41-2 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, aaiU, pilS, pilV, astA, aap, shf, aggA, aggC, agg3A, agg3C, agg4C, virK, rfbU</i>) 231-1 (<i>aaiA, aaiC, virK, rfbU, agg3C,</i>) 591-1 (<i>aatA, aggR, aaiC, pilS, astA, aap, aggA, aggC, virK, rfbU, sigA</i>) 601-1 (<i>aatA, aggR, aaiC, pet, astA, aap, pic, irp2, shf, virK, rfbU, agg3A, agg3C, agg4C, pilS, pilV, sigA</i>) 631-1 (<i>aatA,aggR, aap, irp2,virK,pilV, aggA, aggC, agg3C, agg4C</i>) 2451-3 (<i>aatA, aap, irp2, pilS, pilV</i>) 2701-1 (<i>astA, aap, irp2, virK</i>) 3202-4 (<i>aatA, aaiC, aaiG, pheU, astA, aap,irp2, virK, agg3A, agg3C,</i>) 3682-2 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, pilV, aap, pic, irp2, agg3A, agg3C</i>) 3942-2 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiG, pet, astA, pic, aap, irp2, virK, shf, rfbU, agg3A, agg3C, agg4A, pilV</i>) 4052-2 (<i>aaiA, aaiG, agg3A, virK, agg3C, agg4A, pilV, sigA</i>) 4212-6 (<i>aatA, aaiA, pilS, astA, aap, irp2, virK, agg3C, pilV</i>) 4332-1 (<i>aaiA, astA, virK, rfbU, pilS, pilV</i>) 4692-10 (<i>aaiC, aaiG, virK, rfbU, agg3C, pilS, pilV</i>) 4862-1 (<i>aatA, aggR, pheU, pilS, pilV, pet, astA, aspU, shf, pic, irp2, virK, agg3A, agg3C</i>) 4942-1 (<i>aatA, aap, pheU, pilS, pilV, astA, irp2, agg3C</i>)
	UPEC	11 (<i>shf, irp2, virK</i>) 34 (<i>daaC, agg3C, shf, irp2, virK, rfbU</i>) 46 (<i>aatA, aap, astA, pet, irp2</i>)
B1	EAEC	671-2 (<i>agg3C</i>) 2731-4 (<i>aatA, astA, aap, irp2, agg3C, pilV</i>)
	UPEC	237 (sem marcadores)
B2	EAEC	2341-1 (<i>irp2, virK, pilS</i>) 3291-7 (<i>aatA, aaiC, virK</i>) 672-4 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, pilS, pilV, aap, shf, aggA, aggC, agg3C, irp2, virK</i>)
	UPEC	3 (<i>irp2</i>) 5 (sem marcadores) 12 (<i>rfbU</i>)

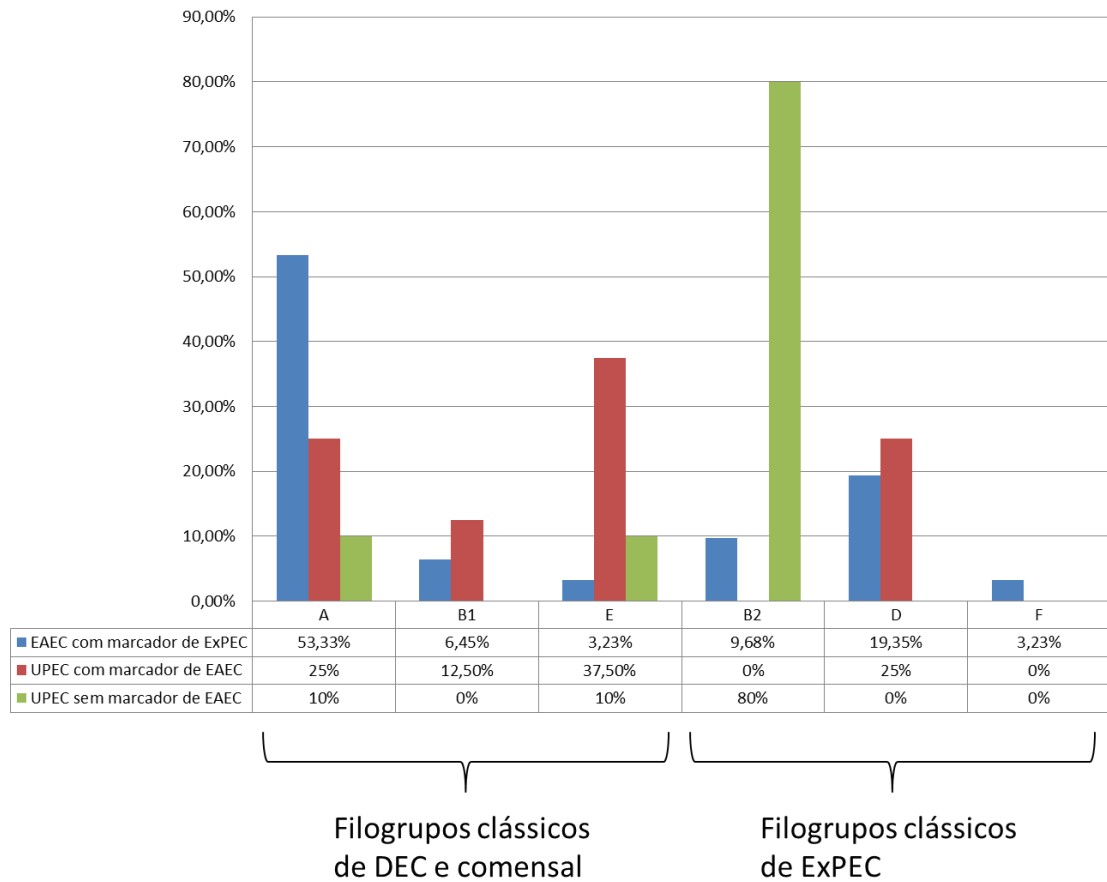
		15 (<i>irp2</i>)
		16 (<i>irp2</i>)
		21 (<i>irp2</i>)
		28 (<i>irp2</i>)
		38 (<i>irp2</i>)
D	EAEC	301-1 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiG, aap, shf, virK, rfbU, agg4A, agg4C</i>)
		641-1 (<i>aatA, aggR, aap, irp2, virK, agg3C, pilS</i>)
		851-10 (<i>aatA, aggR, aap, irp2, virK, rfbU, agg3C, espl</i>)
		1261-1 (<i>aaiC, astA, aap, virK, pilS</i>)
		2051-1 (<i>aatA, aggR, aap, shf, irp2, virK, agg3C</i>)
		4792-1 (<i>aatA, aggR, aap, irp2, virK, agg3C, pilV, espl</i>)
	UPEC	268 (<i>aatA, aggR, aggA, aggC, aap, pic, irp2, pilS, pilV, aaiACGU</i>)
		35 (<i>aatA, aggA, aggC, irp2</i>)
E	EAEC	3122-1 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, aaiU, pilV, aap, shf, pic, irp2, rfbU, agg3A</i>)
	UPEC	1 (<i>irp2</i>)
		231 (<i>astA, irp2</i>)
		240 (<i>astA</i>)
		216 (<i>aatA, aap, astA, shf, irp2</i>)
F	EAEC	421-4 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aap, irp2, pic, virK, agg3A, agg3C, agg4C</i>)
Desconhecido	EAEC	1031-4 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, pilS, pet, aap, shf, pic, irp2, virK</i>)

Em análise comparativa observamos que as cepas de EAEC e UPEC se inseriram em filogrupos diversos, e a distribuição dos grupos estudados foi divergente, considerando os filogrupos clássicos de cepas comensais e DEC (A, B1 e E) e os filogrupos clássicos de ExPEC (B2, D e F). No primeiro grupo estão presentes de maneira mais representativa as cepas de EAEC e UPEC com marcadores de EAEC. No segundo grupo (filogrupos B2, D e F) localizam-se as cepas de UPEC sem marcadores de EAEC. Estes dados podem ser visualizados na tabela 15.

Nas cepas de EAEC a maior distribuição ocorreu no filogrupo A (53,33% das cepas), seguida pelos filogrupos D (19,35%), B2 (9,68%), B1 (6,45%), E e F (3,23% em cada filogrupo). Vale ressaltar que uma cepa de EAEC não pôde ser classificada em nenhum dos filogrupos por esta metodologia.

Já nas cepas de UPEC com marcador de EAEC o filogrupo de maior incidência foi o filogrupo E (37,5% das cepas), seguido dos filogrupos A e D (ambos com 25% das cepas) e filogrupo B1 (12,5% das cepas), sendo que nas cepas de UPEC sem marcador de EAEC a incidência dos filogrupos foi pouco diversa. Neste grupo o filogrupo de maior destaque é o B2, com 80% das cepas, seguidos pelos filogrupos A e E (10% das cepas).

Figura 9 - Filogrupos encontrados nas cepas de EAEC e UPEC com e sem marcador de EAEC.



4.6 Multilocus sequencing typing (MLST)

Após análises filogenéticas pela metodologia descrita por Clermont et al. (2013) as cepas estudadas foram submetidas à análise por MLST. Nesta análise a cepa é submetida a PCR para 7 genes de metabolismo e a partir da análise dessas sequências as cepas são classificadas em *sequence types* (ST) específicos. Em alguns casos é possível também classificá-las em complexos clonais (Cplx), os quais albergam grupamentos de ST relacionados. Esta classificação foi realizada utilizando as ferramentas disponíveis no site da *University of Warwick* (disponível em <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) utilizando o banco de dados de sequências dos 7 genes analisados.

A tabela 16 nos mostra o perfil genético de cada uma destas cepas e a tabela 17 nos mostra o resumo do grupamento dos ST e Cplx quando presente nas cepas estudadas em comparação aos seus filogrupos.

De forma diferente da determinada pela classificação proposta por Clermont (2013), as cepas de EAEC e UPEC estudadas não foram agrupadas de maneira uniforme. O ST mais comum foi o ST 10 (Cplx10), o qual albergou 4 cepas de EAEC, sendo 1 isolada a partir de caso e 3 isoladas a partir de controles assintomáticos, e 1 cepa de UPEC, a qual apresenta marcadores de EAEC. Os demais ST comuns para mais de uma cepa foram o ST 746, albergando 2 cepas de EAEC, sendo 1 isolada a partir de caso e 1 isolada a partir de controle assintomático e o ST 95 (Cplx ST95), albergando 2 cepas de UPEC, as quais não apresentam marcadores de EAEC. Os demais ST estão distribuídos de maneira uniforme, sendo cada um representado por uma cepa diferente. Cabe salientar a determinação de 22 ST não descritos anteriormente, baseando-se nas sequências de alelos não presentes no banco de dados até o presente momento.

Na tabela 17 os dados de filogrupos e ST estão apresentados em conjunto dentro de cada grupo de cepas estudadas, ou seja, EAEC e UPEC com e sem marcadores de EAEC

Tabela 16- *Sequence types* das EAEC e UPEC deste estudo com os respectivos perfis genéticos de cada cepa.

ST	Patótipo	Filogrupo	Cepas (perfil genético)
ST 10 Cplx ST 10	EAEC	A	41-2 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, aaiU, pilS, pilV, astA, aap, shf, aggA, aggC, agg3A, agg3C, agg4C, virK, rfbU</i>) 3202-4 (<i>aatA, aaiC, aaiG, pheU, astA, aap, irp2, virK, agg3A, agg3C,</i>) 3682-2 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, pilV, aap, pic, irp2, agg3A, agg3C</i>) 4052-2 (<i>aaiA, aaiG, agg3A, virK, agg3C, agg4A, pilV, sigA</i>)
	UPEC	A	46 (<i>aatA, aap, astA, pet, irp2</i>)
ST 31 Cplx ST 31	UPEC	D	268 (<i>aatA, aggR, aggA, aggC, aap, pic, irp2, pilS, pilV, aaiACGU</i>)
ST 48 Cplx ST 10	UPEC	A	34 (<i>daaC, agg3C, shf, irp2, virK, rfbU</i>)
ST 59 Cplx ST 59	UPEC	A	11 (<i>shf, irp2, virK</i>)
ST 95 Cplx ST 95	UPEC	B2	21 (<i>irp2</i>) 28 (<i>irp2</i>)
ST 73 Cplx ST 73	UPEC	B2	38 (<i>irp2</i>)
ST 131 Cplx ST 73	EAEC	B2	2341-1 (<i>irp2, virK, pilS</i>)
ST 144	EAEC	B2	3291-7 (<i>aatA, aaiC, virK</i>)
ST 164	EAEC	B1	671-2 (<i>agg3C</i>)
ST 226	EAEC	A	631-1 (<i>aatA, aggR, aap, irp2, virK, pilV, aggA, aggC, agg3C, agg4C</i>)
ST 501	EAEC	D	851-10 (<i>aatA, aggR, aap, irp2, virK, rfbU, agg3C, espI</i>)
ST 543	UPEC	E	240 (<i>astA</i>)
ST 746	EAEC	A	601-1 (<i>aatA, aggR, aaiC, pet, astA, aap, pic, irp2, shf, virK, rfbU, agg3A, agg3C, agg4C, pilS, pilV, sigA</i>) 3942-2 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiG, pet, astA, pic, aap, irp2, virK, shf, rfbU, agg3A, agg3C, agg4A, pilV</i>)
ST 789	EAEC	A	2701-1 (<i>astA, aap, irp2, virK</i>)
ST 998	UPEC	B2	12 (<i>rfbU</i>)
ST 1057	UPEC	B2	5 (sem marcadores)
ST 1423	UPEC	B1	237 (sem marcadores)
ST 2451	EAEC	B2	672-4 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, pilS, pilV, aap, shf, aggA, aggC, irp2, virK, agg3C</i>)

ST 4628	EAEC	A	4942-1 (<i>aatA, aap, pheU, pilS, pilV, astA, irp2, agg3C</i>)
ST 5697	EAEC	A	4212-6 (<i>aatA, aaiA, pilS, astA, aap, irp2, virK, agg3C, pilV</i>)
ST 5802	EAEC	D	2051-1 (<i>aatA, aggR, aap, shf, irp2, virK, agg3C</i>)
ST 5803	EAEC	B1	2731-4 (<i>aatA, astA, aap, irp2, agg3C, pilV</i>)
ST 5804	EAEC	A	4692-10 (<i>aaiC, aaiG, virK, rfbU, agg3C, pilS, pilV</i>)
ST 5805	UPEC	E	1 (<i>irp2</i>)
ST 5806	UPEC	B2	3 (<i>irp2</i>)
ST 5807	UPEC	B2	15 (<i>irp2</i>)
ST 5809	UPEC	E	231 (<i>astA, irp2</i>)
ST 5810	EAEC	A	231-1 (<i>aaiA, aaiC, virK, rfbU,agg3C</i>)
ST 5812	EAEC	Desconhecido	1031-4 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, pilS, pet, aap, shf, pic, irp2, virK</i>)
ST 5813	UPEC	B2	16 (<i>irp2</i>)
ST 5815	EAEC	D	641-1 (<i>aatA, aggR, aap, irp2, virK, agg3C, pilS</i>)
ST 5816	EAEC	D	1261-1 (<i>aaiC, astA, aap, virK, pilS</i>)
ST 5817	EAEC	E	3122-1 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aaiG, aaiU, pilV, aap, shf, pic, irp2, rfbU, agg3A</i>)
ST 5818	EAEC	A	4332-1 (<i>aaiA, astA, virK, rfbU, pilS, pilV</i>)
ST 5820	EAEC	A	4862-1 (<i>aatA, aggR, pheU, pilS, pilV, pet, astA, aspU, shf, pic, irp2, virK, agg3A, agg3C</i>)
ST 5829	EAEC	A	2451-3 (<i>aatA, aap, irp2, pilS, pilV</i>)
ST 5830	EAEC	A	591-1 (<i>aatA, aggR, aaiC, pilS, astA, aap, aggA, aggC, virK, rfbU, sigA</i>)
ST 5831	EAEC	F	421-4 (<i>aatA, aggR, aaiA, aaiC, aap, irp2, pic, virK, agg3A, agg3C, agg4C</i>)
ST 5832	UPEC	E	216 (<i>aatA, aap, astA, shf, irp2, iha</i>)
ST 5833	EAEC	D	301-1 (<i>aatA,aggR, aaiA, aaiG, aap, shf, virK, rfbU, agg4A, agg4C</i>)
ST 5843	UPEC	D	35 (<i>aatA, aggA, aggC, irp2</i>)
ST 5844	EAEC	D	4792-1 (<i>aatA, aggR, aap, irp2, virK, agg3C, pilV, espI</i>)

Tabela 17- Grupamento dos ST de acordo com o patótipo estudado.

	Filogrupo (nº de cepas)	ST ^a (nº de cepas)
EAEC	A (16); B1 (2); B2 (3); D (6); E (1); F (1); DESCONHECIDO (1).	ST 10 Cplx ST 10 (4) ; ST 131 Cplx ST 73 (1); ST 144 (1); ST 164 (1); ST 226 Cplx ST 226 (1); ST 501 (1); ST 746 (2) ; ST 789 (1); ST 2451 Cplx ST 131 (1); ST 4628 (1); ST 5697 (1); ST 5802 (1); ST 5803 (1); ST 5804 (1); ST 5810 (1); ST 5812 (1); ST 5815 (1); ST 58 16 (1); ST 5817 (1); ST 5818 (1); ST 5820 (1); ST 5829 (1); ST 5830 (1); ST 5831 (1); ST 5833 (1); ST 5844 (1).
UPEC com marcador de EAEC	A (2); B1 (1); D(2); E (3).	ST 10 Cplx ST10 (1) ; ST31Cplx ST 31 (1); ST 48 Cplx 10 (1); ST 543 (1); ST 1423 (1); ST 5809 (1); ST 5832 (1); ST 5843 (1).
UPEC sem marcador de EAEC	A (1); B2(8), E (1).	ST 59 Cplx ST 59 (1); ST 95 Cplx ST 95 (2) ; ST 73 Cplx ST 73 (1); ST 998 (1); ST 1057 (1); ST 5805 (1); ST 5806 (1); ST 5807 (1); ST 5813 (1).

^a *Sequence types* destacados por cores. Amarelo: ST 10 Cplx10, o qual alberga 4 EAEC e 1 UPEC; Azul: ST 746, o qual alberga 2 EAEC; Verde: ST 95 Cplx ST95, o qual alberga 2 UPEC. Os demais ST encontrados são representados por somente 1 cepa cada.

4.7 Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos de alguns genes *housekeeping* das cepas de EAEC e UPEC foram obtidas com a finalidade de analisar as relações filogenéticas dessas cepas entre si e entre as seguintes cepas protótipo: EAEC 042 (filogrupo D), EAEC 078:H10 (filogrupo A) e UPEC CFT073 (filogrupo B2).

As sequências dos genes utilizados para obtenção dos ST das cepas foram analisadas, permitindo a construção do filograma apresentado na figura 10.

Observa-se o grupamento das cepas em três *clusters* principais que foram aqui denominados A1, A2 e B.

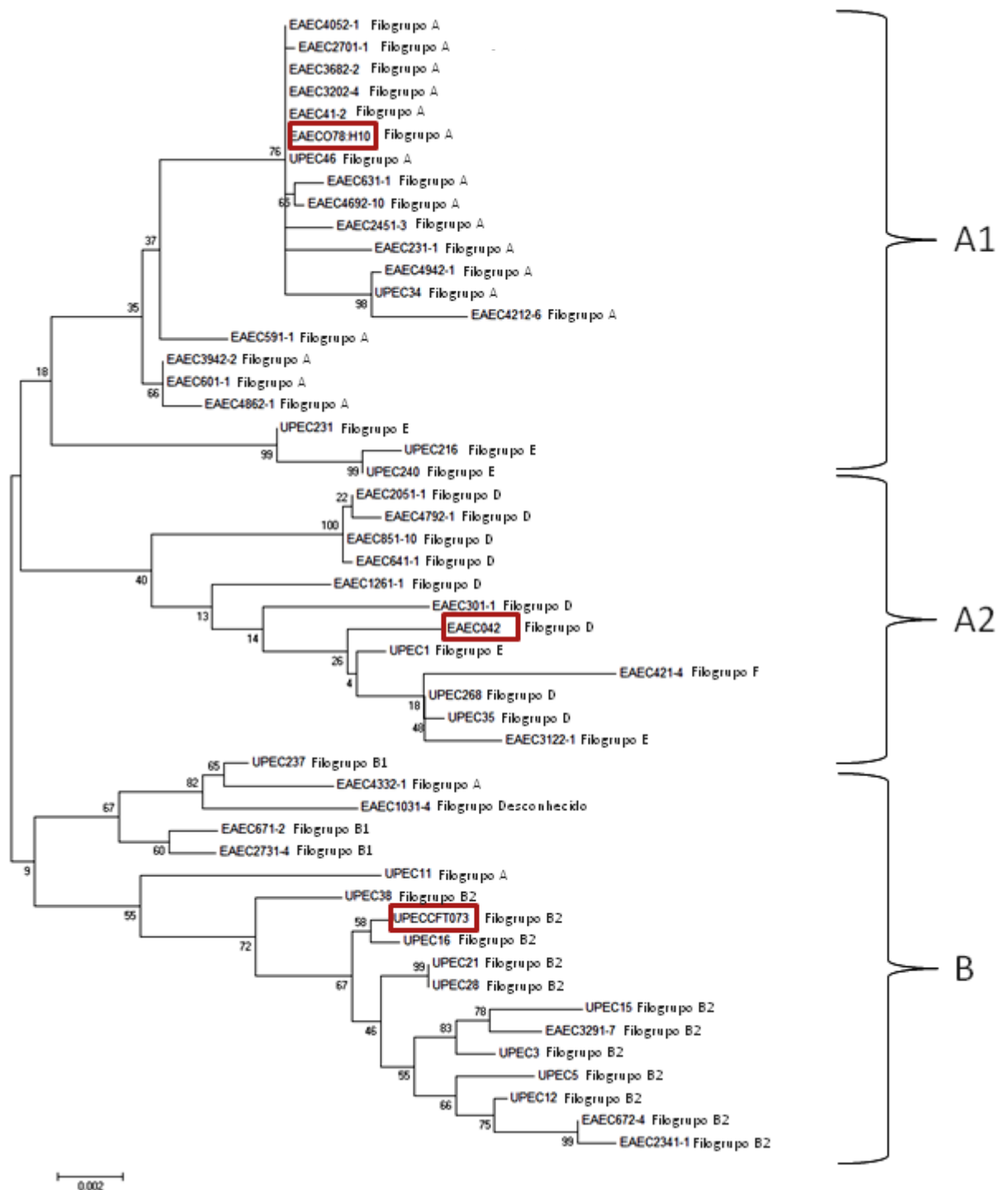
No A1 encontram-se 21 cepas, sendo 16 EAEC (incluindo a cepa protótipo 078:H10) e 5 UPEC com marcadores de EAEC. As cepas deste *cluster* pertenceram aos filogramas A (18 cepas, incluindo a protótipo) e E (3 cepas).

O *cluster* A2 foi composto por 12 cepas, sendo 9 EAEC (incluindo a protótipo 042) e 3 UPEC (2 com e 1 sem marcadores de EAEC). As cepas deste *cluster*

pertenceram aos filogrupos D (9 cepas, incluindo a protótipo), E (2 cepas) e F (1 cepa).

Dezoito cepas pertenceram ao *cluster* B, sendo 7 EAEC, 1 UPEC com e 10 UPEC sem marcadores de EAEC (incluindo a protótipo CFT073). As cepas deste *cluster* pertenceram aos filogrupos B2 (12 cepas, incluindo a protótipo), B1 (3 cepas), A (2 cepas) e 1 cepa de filogrupo desconhecido.

Figura 10- Árvore filogenética das cepas de EAEC e UPEC deste estudo.



O filograma foi construído através do método *maximum likelihood* utilizando *bootstrap* com 1.000 réplicas. As cepas foram agrupadas em três *clusters* principais (A1, A2 e B), os quais estão destacados. Além das cepas de EAEC e UPEC (com e sem marcadores de EAEC) deste estudo, o filograma abrange também as cepas protótipo de EAEC (042 e O78:H10) e UPEC (CFT073), as quais encontram-se destacadas.

5 DISCUSSÃO

E. coli é classificada em patótipos distintos de acordo com o seu sítio de infecção e características de virulência, como padrões de adesão a células epiteliais, produção de toxinas, invasão e adesão à mucosa intestinal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Porém, esta classificação deve ser feita e analisada com muito cuidado, por conta da plasticidade genética existente nesta espécie. Esta plasticidade pode ser exemplificada pela *E. coli* O104:H4 causadora de um surto alimentar na Europa em 2011. Esta cepa classificada como sendo um híbrido de EAEC e STEC infectou 3167 pessoas que desenvolveram diarreia com 16 óbitos decorrentes e 908 pessoas que desenvolveram diarreia e SHU, sendo que deste grupo 34 pessoas vieram a óbito (RASKO et al., 2011).

É de conhecimento geral que, por serem muito diversas, cepas de UPEC podem albergar genes de EAEC em seu genoma e que cepas de EAEC também podem apresentar genes característicos de UPEC (ABE et al., 2008; BOLL et al., 2013; NAZEMI et al., 2011; OLESEN et al., 2012; PARK et al., 2009, WALLACE-GADSDEN et al., 2007).

Um estudo realizado por Herzog et al. (2013) relatou o caso de uma paciente que apresentou diarreia severa e vômitos causados por uma infecção mista de uma cepa de EPEC e duas cepas distintas de EAEC. O quadro clínico evoluiu para uma infecção do trato urinário seguida de sepse, ambos causados por uma das cepas de EAEC. Neste caso as duas cepas de EAEC que causaram a infecção da paciente eram positivas para diversos genes característicos de EAEC, como *aatA*, *aggR*, *aap*, *agg3A*, *agg3C*, *agg4A*, *pic*, dentre outros, e as cepas pertenciam aos ST 3067 e 484. Apesar de causarem ITU e bacteremia estas cepas não foram submetidas à análise para genes de virulência característicos de UPEC. Casos como estes nos dão indícios de que cepas de EAEC e UPEC se correlacionam de alguma forma.

Dessa forma, a primeira etapa deste estudo concentrou-se na avaliação de uma grande coleção de EAEC quanto à presença de marcadores genéticos de *E. coli* extraintestinais. Essas cepas foram isoladas tanto de casos com diarreia como de controles sadios (GOMES et al., 1998). Segundo a metodologia proposta por

Johnson et al. (2003), 32,6% das cepas de EAEC avaliadas foram classificadas como ExPEC. Esta metodologia consiste na identificação de cinco genes (*papA* e *papC*, *iutA*, *sfa/foc*, *afa/dra* e *kpsMT II*) característicos de UPEC, sendo que a presença dois ou mais desses genes na cepa a classifica como sendo uma ExPEC. Os dados na literatura quanto à presença de genes relacionados a ExPEC em cepas de EAEC são escassos. Wallace-Gadsden et al. (2007) mostraram que 7,6% das cepas de EAEC por eles estudadas pertenciam ao ST 69, o qual é relacionado a cepas de UPEC. Este número é inferior ao detectado no presente estudo e esta diferença pode se dar pela diferença das populações estudadas, mas, principalmente, pelos diferentes métodos utilizados para determinação e análise das cepas.

Um ponto a ser ressaltado é a presença de cepas de EAEC classificadas como ExPEC em controles assintomáticos. Neste estudo 12 cepas isoladas de controles apresentaram essa característica. Isso indica a possível colonização intestinal assintomática por cepas de EAEC com potencial uropatogênico. A partir dessa colonização a cepa patogênica pode entrar em contato com o trato urinário, ascender à uretra e causar infecções (MANGES; JOHNSON, 2012; OKHUYSEN; DUPONT, 2010; SMITH et al., 2007; STEINER et al., 2000).

É sabido também que EAEC causa inflamação intestinal persistente e pode se manter assintomática durante longos períodos, causando déficit físico e cognitivo relacionados à indução de processos inflamatórios intestinais (OKHUYSEN; DUPONT, 2010; STEINER et al., 2000). Vale lembrar que não somente a presença de certos genes confere virulência à bactéria. A virulência e a patogênese dependem da regulação e coordenação da expressão de genes e regulons específicos para silenciar associações comensais no intestino e, assim, responder a mudanças ambientais, promovendo a patogenicidade no trato urinário e/ou intestinal (ALTERI; MOBLEY, 2012).

A seleção das cepas de EAEC com marcadores de ExPEC permitiu a continuidade do presente projeto no sentido de analisar suas relações com cepas de UPEC. Ao pesquisar a presença de marcadores de virulência de DEC em cepas de UPEC, Abe et al. (2008) evidenciou-se um grupo com características genéticas e/ou fenotípicas clássicas do patótipo EAEC (sonda *aatA* e/ou padrão de adesão AA).

Algumas dessas cepas foram então avaliadas no presente estudo, incluindo também UPEC sem marcadores de EAEC do mesmo trabalho.

Nazemi et al. (2011) verificaram que em uma coleção de UPEC 42,6% das cepas possuíam pelo menos um dos três genes característicos de EAEC investigados (*aap*, *aggR* e *aatA*). Outros autores também detectaram genes característicos de EAEC (*aggR* e *aap*) em 18% das cepas de *E. coli* isoladas de ITU (PARK et al., 2009). Conforme mencionado anteriormente, Abe et al. (2008) mostraram que 7,1% das UPEC estudadas apresentavam características de EAEC.

Após a seleção dos três grupos de cepas (EAEC com marcadores de ExPEC, UPEC com e sem marcadores de EAEC) para este estudo, as mesmas foram analisadas quanto à presença de marcadores de virulência de EAEC, complementando os dados obtidos anteriormente (ABE et al., 2008; ELIAS et al., 1999; ELIAS et al., 2002; GOMES et al., 1998). Essa análise incluiu, entre outros, a pesquisa de genes relacionados à biogênese das fímbrias AAF de EAEC e de proteínas autotransportadoras da família das SPATE (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

A análise dos genes que codificam fímbrias características de EAEC nas cepas de UPEC mostrou que somente as cepas com marcadores de EAEC albergavam estes genes, sendo que duas cepas (cepa 35 e 268) apresentaram os genes relacionados à fímbria AAF/I, a qual é responsável pelo padrão de adesão AA da cepa 17-2 (NATARO et al., 1992) e está associada à uropatogênese da cepa de UPEC O78:H10 causadora de um surto de ITU na Dinamarca (BOLL et al., 2013).

Apesar de esta fímbria ser responsável pela adesão agregativa da cepa 17-2, as cepas 35 e 268 apresentaram o padrão de adesão citodestacante ou não aderente. A cepa 35 (não aderente) não possui o regulador global *aggR*, que é responsável por ativar a transcrição deste gene (NATARO et al., 1994). Já a cepa 268 possui este regulador, porém por possuir o gene *hly*, que é responsável pela produção da α -hemolisina, apresenta o padrão citodestacante responsável por este fenótipo (GOMES et al., 1995).

A cepa 268 além dos genes *aggA* e *aggC* apresenta também os genes *pilS* e *pilV*, os quais codificam a fímbria Pil presente em EAEC e associada ao padrão AA

(DUDLEY et al., 2006a). As cepas de UPEC sem marcadores de EAEC não apresentaram gense codificante para fímbrias de EAEC.

Por outro lado, no grupo das EAEC a maioria das cepas apresentou pelo menos um gene relacionado à biogênese de AAF/III e Pil, sendo que somente 13% apresentaram genes relacionados à AAF/I. O papel das fímbrias AAF/III e Pil na patogênese da ITU não é conhecido. Chama a atenção essa alta ocorrência de ambas as fímbrias em EAEC, discordando de dados da literatura (BOISEN et al., 2012; ELIAS et al., 1999; GIOPOPO et al., 2000). Entretanto, não foi analisado neste estudo se essas fímbrias são produzidas.

Com relação às proteínas autotransportadoras não houve grandes diferenças entre os grupos de UPEC com e sem marcadores de EAEC. Em ambos os casos Sat foi a proteína mais presente (37,5% nas cepas com marcador e 41,6% nas cepas sem marcador de EAEC). Esta proteína também foi a mais presente nas cepas de EAEC, com um total de 30% das cepas positivas para este gene. Esta toxina é encontrada tanto em cepas de UPEC quanto em cepas de EAEC. Nas cepas de UPEC esta toxina possui uma atividade citotóxica vacuolizante nas células epiteliais da bexiga e rins (ANDERSON et al., 2004; GUYER et al., 2000; GUYER et al., 2002). Já foi descrito que em cepas de DAEC Sat promove a indução do rearranjo de proteínas *tight junction* e aumento da permeabilidade celular, o que leva à diarreia. Em EAEC Sat promove estas mesmas funções (CLEMENTS et al., 2012), o que representa um importante fator de uropatogenicidade nessas cepas.

Pic é uma proteína autotransportadoras que apresenta atividade mucinolítica e mucinogênica e de hemaglutinação. Esta proteína está envolvida na patogênese inicial de EAEC e está envolvida na colonização de cepas que a produzem (ABREU et al., 2013; HENDERSON et al., 1999; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Além de ser encontrada em cepas de EAEC, *pic* também já foi encontrada em cepas de EAEC causadoras de ITU (ABE et al., 2008; HERZOG et al., 2013) e cepas de UPEC onde é denominada PicU (PARHAM et al., 2004). A presença deste gene nas UPEC utilizadas neste estudo já havia sido reportada por Abe et al. (2008), sendo este presente em 12,5% das cepas de UPEC com marcador de EAEC e 16,6% das cepas de UPEC sem marcador de EAEC. Este mesmo gene foi encontrado em 16,6% das cepas de EAEC estudadas, o que não demonstra nenhuma diferença de distribuição entre as cepas utilizadas. PicU foi associada a UPEC que causam

pielonefrite e é expressa no curso da infecção (HEIMER et al., 2004), o que indica um importante papel dessa proteína na uropatogenicidade.

Os demais genes associados ao patótipo EAEC detectados nos três grupos de cepas aqui estudados não são exclusivos de EAEC, ou seja, podem ser detectados em outros patótipos (ABREU et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; CZEZULIN et al., 1999; FALLARINO et al., 1997; HEILMANN et al., 1996; MONTEIRO et al., 2009; SAVARINO et al., 1996; SCHUBERT et al., 1998). *VirK* é uma proteína periplasmática de Enterobacteriaceae requerida para a secreção eficiente de Pet (TAPIA-PASTRANA et al., 2012). Este gene foi encontrado em 24 (80%) das cepas de EAEC e em menor proporção nas cepas de UPEC, em somente 2 cepas (11,11%). O gene *rfbU* está relacionado à síntese de lipopolissacarídeo e é encontrado também em *Vibrio cholerae* (FALLARINO et al., 1997). Este gene foi encontrado em maior proporção nas cepas de EAEC, sendo presente em 10 cepas (33,33%) e em menor proporção nas cepas de UPEC, presente em 2 cepas (11,11%), assim como ocorreu com o gene *virK*. Os genes do operon *aai* codificam um sistema de secreção do tipo VI (DUDLEY et al., 2006b). Estes genes foram encontrados em somente uma cepa de UPEC (5,55%). Com relação as cepas de EAEC, 12 (40%) eram positivas para o gene *aaiA*, 13 (43,33%) para o gene *aaiC*, 9 (30%) para o gene *aaiG* e somente 1 (3,33%) para o gene *aaiU*. Apesar de serem encontrados em diferentes proporções, estes genes foram encontrados tanto em cepas de EAEC quanto em cepas de UPEC.

Os únicos genes relacionados às fímbrias de UPEC encontrados nas cepas de EAEC foram os das fímbrias P e Afa, sendo a fímbria P a mais frequente. Esta mesma abordagem foi realizada por Olesen et al. (2012), sendo que os genes *papA* e *papC* não foram encontrados nas cepas de EAEC. Por outro lado, as cepas de UPEC apresentaram perfis distintos quando analisadas separadamente nos grupos com e sem marcadores de EAEC, onde notadamente o grupo sem marcadores apresentou maior frequência dos genes das fímbrias P e S. Não há relatos na literatura com esse tipo de análise comparativa. Em resumo, esses achados apontam que cepas de EAEC podem apresentar um conjunto complexo de adesinas que medeiam adesão tanto no intestino quanto no trato urinário.

A classificação filogenética das cepas de EAEC (com marcadores de ExPEC) e de UPEC (com e sem marcadores de EAEC) foi realizada pelo método de PCR

quadruplex descrito por Clermont et al. (2013). Neste método as cepas de *E. coli* podem ser classificadas em sete filogrupos distintos: A, B1, B2, C, D, E e F. Já foi demonstrado que as cepas responsáveis por infecções extraintestinais são mais relacionadas aos filogrupos B2 ou D, e os filogrupos A e B1 são mais relacionados à cepas comensais. As DEC são encontradas principalmente nos grupos filogenético A, B1 e E, sendo que os filogrupos C e F são encontrados em menor proporção em relação aos demais grupos (JOHNSON; STELL, 2000; JOHNSON; RUSSO, 2001; PICARD et al., 1999; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

As cepas de EAEC que foram objeto de estudo neste trabalho pertenceram aos mesmos grupos filogenéticos de cepas de UPEC com marcadores de EAEC (filogrupos A, B1, D e E), o que indica que estas cepas apresentam correlação entre si e potencial uropatogênico, embora isto não tenha sido avaliado *in vitro* ou *in vivo*.

As mesmas cepas de EAEC, que se relacionam com cepas de UPEC com marcador de EAEC não estão distribuídas de maneira uniforme nos mesmos grupos filogenéticos de cepas de UPEC sem marcadores genéticos de EAEC, sendo estas majoritariamente encontradas no filogrupo B2, mostrando desta forma uma diferença importante entre estes grupos.

Toval et al. (2013) caracterizaram cepas de UPEC isoladas a partir de ITU com relação aos seus grupos filogenéticos e encontraram forte relação das UPEC com os filogrupos B2 e D (55,8% das cepas analisadas). Outros trabalhos sobre filogenia também correlacionam estes filogrupos às cepas de UPEC (JOHNSON; RUSSO, 2001; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; TRAMUTA et al., 2014). No estudo de Toval et al. (2013) foi observada baixa correlação entre as cepas de UPEC e o filogrupo E, sendo este encontrado em somente 1,1% das cepas analisadas.

A análise das cepas de UPEC com marcador de EAEC deste trabalho nos mostrou que o filogrupo de maior incidência foi o E (37,5% das cepas), seguido de A, D (ambos com 25% das cepas) e B1 (12,5% das cepas), sendo estes filogrupos mais associados a cepas de *E. coli* comensais e DEC. Estes dados divergem dos dados de UPEC encontrados em literatura, porém, em contrapartida, as cepas de UPEC sem marcador de EAEC apresentaram um padrão filogenético que melhor se assemelha aos encontrados por outros autores (JOHNSON; RUSSO, 2001; SMITH,

FRATAMICO; GUNTHER, 2007; TRAMUTA et al., 2014). Nestas cepas a maior incidência foi do filogrupo B2, com 80% das cepas.

Uma possível explicação para tal fato está justamente relacionada com a presença ou ausência dos marcadores moleculares de EAEC, já que estas cepas de UPEC com marcador de EAEC poderiam ser originalmente classificadas como EAEC presente em portadores assintomáticos, as quais na linha evolutiva incorporaram genes de virulência característicos de UPEC, tornando-se então capazes de causar ITU. As cepas de UPEC que incorporaram estes genes de outros patótipos de DEC em seu genoma podem ser denominadas de UPEC atípicas, ou aUPEC, conforme proposto por Toval et al. (2013).

Em um estudo conduzido por Frömmel et al. (2013) foi mostrado que cepas de *E. coli* da microbiota intestinal são mais relacionadas com os filogrupos A (36,8%), B2 (42,1), B1 (10,5%) e D (10,5%), sendo que as cepas que apresentam genes de ExPEC são mais relacionadas ao filogrupo B2. Nas cepas de EAEC deste estudo o filogrupo A (53,33% das cepas) foi o mais frequente. Os filogrupos D (19,35%), B2 (9,68%), B1 (6,45%), E e F (3,23% em cada filogrupo) foram encontrados em menor proporção.

Uma cepa de EAEC (1031-4) não pôde ser classificada em nenhum filogrupo conhecido, ao menos pelo perfil de amplificação na quadruplex PCR. Esta cepa apresentou amplificação somente do fragmento TspE4C2. No trabalho de Iranpour et al. (2015) foi demonstrado que uma fração de 27,1% das cepas não puderam ser classificadas por este método. Em contrapartida Clermont et al. (2013) relatam que cepas com este tipo de amplificação são raras e nenhuma das cepa na coleção ECOR apresentou este tipo de amplificação. Esses autores ainda recomendam a classificação de cepas com este genótipo por MLST. A tipagem por este método permitiu classificar a cepa 1031-4 deste estudo no ST 5812, o qual é um ST novo descrito no presente trabalho.

Esta diferença nas proporções dos filogrupos encontrados pode se dar pelo fato de que poucos trabalhos (IRANPOUR et al., 2015; TOVAL et al., 2013) utilizaram o novo método de classificação filogenética por quadruplex PCR descrito por Clermont et al. (2013). Os demais trabalhos encontrados na literatura utilizam o método anteriormente descrito pelos mesmos autores (CLERMONT et al., 2000), o

qual utiliza uma PCR triplex, que pode erroneamente classificar as cepas (CLERMONT et al., 2013).

Além deste fato, as prevalências divergentes dos grupos filogenéticos encontrados em diversos estudos podem ser explicadas pelos diferentes estados de saúde do paciente infectado, dieta e condições ambientais, sociais e geográficas (DERAKHSHANDEH et al., 2013).

Atualmente existem três esquemas de MLST que podem ser utilizados para *E. coli*, os quais são hospedados em sites da Universidade Estadual de Michigan (EUA), na Escola Médica da Universidade de Warwick (Reino Unido) e no Instituto Pasteur (França), sendo que os três esquemas são baseados na identificação e na análise de sete genes metabólicos. Esta análise nos dá meios de identificar novos alelos, sendo que combinações alélicas diferentes produzem ST diferentes (CLERMONT; GORDON; DENAMOUR, 2015).

Apesar das diferenças existentes entre as três abordagens, a congruência observada entre as filogenias derivadas de sequências concatenadas e a filogenia baseada no sequenciamento completo do genoma de *E. coli* nos mostra que o melhor método é o esquema apresentado pelos genes de MLST da Universidade de Warwick (SAHL et al., 2012), utilizado no presente trabalho.

Em novembro de 2015 havia 5852 ST definidos para *E. coli* pelo esquema proposto por Wirth et al. (2006), o qual utiliza a amplificação dos genes *adf*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA* para análise. A análise desses genes nas 48 cepas do presente estudo permitiu identificar 42 destes ST, sendo 22 (45,83%) destes ST gerados a partir de novos alelos ou novas combinações alélicas, resultantes de novas combinações.

Os dois métodos de filogenia usados neste estudo mostraram-se discordantes no sentido de que as cepas não foram agrupadas de maneira uniforme quando analisadas por MLST, ao passo que pela metodologia de Clermont et al. (2013) as cepas foram claramente agrupadas como esperado.

No presente estudo o ST mais comum foi o ST10 (Cplx ST10), sendo que todas as cepas encontradas neste ST pertenceram ao grupo filogenético A. Este ST foi encontrado em alta frequência em várias coleções de *E. coli* (BANERJEE et al., 2013; CHATTAWAY et al., 2014; DALLMAN et al., 2014; OKEKE et al., 2010;

OLESEN et al., 2012). Um fato interessante é que neste grupo foram encontradas quatro cepas EAEC e uma cepa de UPEC com marcador de EAEC, sendo que nenhuma cepa de UPEC sem marcadores de virulência específicos de EAEC foi encontrada neste grupo. Este dado vai de encontro com os dados publicados por Olesen et al. (2012), o qual descreve uma cepa de EAEC O78:H10, pertencente ao ST 10/grupo filogenético A, causadora de um surto de ITU, o que indica que cepas pertencentes a este ST específico se correlacionam e podem causar tanto infecções intestinais quanto infecções do trato urinário.

Outros dois ST encontrados em mais de uma cepa analisada foram os ST 95 Cplx ST95 (2 UPEC – filogrupo B2) e ST 746 (2 EAEC – filogrupo A).

ST95 compreende um dos grupos clonais predominantes de ExPEC os quais compreendem os grupos ST131, ST69, ST95 e ST73. Este grupo pertence ao grupamento filogenético B2 e é tradicionalmente relacionado à meningite neonatal (RILEY, 2014). Já foi relatado que aves domésticas podem ser reservatório para este grupo de *E. coli*, sendo estas cepas de *E. coli* aviária (APEC) relacionada a cepas causadoras de infecções extraintestinais (MORA et al., 2013; NANDANWAR., 2014)

Foi reportado um caso de uma cepa ST746 produtora de carbapenemase que causou diarreia do viajante em um paciente dinamarquês, que havia viajado para o Egito e Turquia (GEDEBJERG et al., 2015).

Os demais ST encontrados neste trabalho foram bastante diversos, sendo cada ST representado por uma cepa diferente. Isto pode se dar pelo fato de que as cepas analisadas foram provenientes de estudos epidemiológicos, e não de surtos de diarreia ou infecção do trato urinário, os quais são mais prováveis de apresentarem cepas pertencentes ao mesmo ST.

No presente estudo não encontramos nenhuma cepa pertencente ao ST38, o qual é altamente associado a *E. coli* extraintestinal e a cepas de EAEC (CHATTAWAY et al., 2011). Esses mesmos autores ainda sugerem que cepas híbridas de EAEC/UPEC são emergentes

Cepas de EAEC isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda na infância conduzido na Nigéria também foram analisadas por MLST utilizando o mesmo esquema do presente trabalho (OKEKE et al., 2010). Foram

determinados 96 ST distintos, mas 40% das cepas pertenceram aos ST 10, 31 ou 394, com predomínio do ST 10. Além disso, esses autores encontraram associação entre cepas pertencentes ao complexo ST 10 e o risco de doença diarreica em crianças maiores de um ano (OKEKE et al., 2010). Além de ser associado a cepas de EAEC, o ST 10 é associado a múltiplos patótipos de *E. coli*, tais como UPEC, EHEC e EPEC (CHATTAWAY et al., 2014; MELLMANN et al., 2008; MOURA et al., 2009).

Em um estudo empregando 564 cepas de EAEC isoladas na Nigéria, Bangladesh e Reino Unido foram descritos 126 ST diferentes para cepas de EAEC isoladas tanto de crianças quanto de adultos. A tipagem por MLST foi realizada pela mesma metodologia utilizada neste trabalho e mostrou que a maioria das cepas estudadas pertenciam aos ST 10, 31, 38, 40, 394 e 295, sendo que somente 6,2% das cepas pertenceram a ST novos (CHATTAWAY et al., 2014). Estes dados divergem dos encontrados neste trabalho, já que 45,83% das cepas estudadas pertencem a ST que não haviam sido descritos anteriormente. Ao analisar cepas de EPEC por MLST com estes mesmos genes, Pitondo-Silva et al. (2008) encontraram que 48% das cepas representaram novos ST. Apesar da diferença entre os patótipos, estes dados vão de encontro com os encontrados em EAEC neste trabalho.

A partir das sequências dos genes empregados na determinação dos ST foi possível construir um filograma com o intuito de analisar as relações filogenéticas das cepas do presente estudo, entre si e entre as algumas cepas protótipo. Para este fim foram escolhidas as cepas EAEC 042 (CZECZULIN et al., 1999), EAEC O78:H10 (OLESEN et al., 2012) e UPEC CFT073 (ALTERI; MOBLEY, 2012). Neste filograma foi possível observar o grupamento de três *clusters* principais: A1, A2 e B.

Em termos gerais, as cepas de EAEC e UPEC com marcadores de EAEC agruparam-se majoritariamente nos clusters A1 e A2, juntamente com as protótipos O78:H10 (A1) e EAEC 042 (A2), de forma indistinta. Em contrapartida, as cepas de UPEC sem marcadores de EAEC pertenceram ao *cluster* B juntamente à cepa protótipo de UPEC CFT073, que não apresenta marcadores de EAEC. A construção do filograma permitiu desta forma a separação distinta das cepas deste estudo quanto à presença ou ausência de marcadores de EAEC. Isto mostra que cepas de *E. coli* devem ser categorizadas com base em seus genótipos e não quanto ao sítio

de isolamento (ALTERI; MOBLEY, 2012). Além disso, os grupamentos no filograma estão de acordo com o método de filotipagem de Clermont et al. (2013), também aplicado nessas cepas, evidenciando a aplicabilidade desta última técnica.

Em resumo, os resultados aqui obtidos indicam que cepas de *E. coli* isoladas de ITU que apresentam marcadores genéticos de EAEC devem ser classificadas como EAEC, as quais foram capazes de entrar em contato com o ambiente do trato urinário causando infecção urinária. Além disso, fica evidente que entre cepas de EAEC isoladas do trato intestinal há um subgrupo com perfil genético de *E. coli* extraintestinais e potencial uropatogênico. Entretanto, o potencial uropatogênico desse último grupo necessita de análises *in vitro* e *in vivo* complementares não abordadas neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Um subgrupo de cepas de EAEC está inserido nos mesmos grupos filogenéticos de cepas de UPEC com marcadores de EAEC, apresentando, portanto, correlação filogenética.
- ✓ Há diferenças de distribuição filogenética entre cepas de UPEC com e sem marcador de EAEC.
- ✓ Cepas de EAEC podem apresentar potencial uropatogênico, tanto no curso de uma infecção diarreica, quanto em carreadores assintomáticos.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M.; SALVADOR, F. A.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, M. A.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MACHADO, A. M.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R. T.; GOMES, T. A. T. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 397-406, 2008.
- ABREU JUNIOR, A. G. **Caracterização da proteína Pic (plasmid encoded toxin) em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2015. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.
- ABREU, A. G.; BUERIS, V.; PORANGABA, T. M.; SIRCILI, M. P.; NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p, 411-414. 2013.
- AGARWAL, J.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 30, p. 141-149, 2012.
- ALM, E. W.; WALK, S. T.; GORDON, D. M. The niche of *Escherichia coli* in population genetics of bacteria. ASM Press. 2011. p. 107–123.
- ALTERI, C. J.; MOBLEY, H. L. T. *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 15, p. 3-9, 2012.
- AMORIM, J. H.; DEL-COGLIANO, M. E.; FERNANDEZ-BRANDO, R. J.; BILEN, M. F.; JESUS, M. R.; LUIZ, W. B.; PALERMO, M. S.; FERREIRA, R. C.; SERVAT, E. G.; GHIRINGHELLI, P. D.; FERREIRA, L. C.; BENTANCOR, L. V. Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches. **F1000 Res.**, v. 3, p. 74-82, 2014.
- ANDERSON, K. L.; COTA, E.; SIMPSON, P.; CHEN, H. A.; DU MERLE, L.; BOUGUENEC, C. L.; MATTHEWS, S. Complete resonance assignments of a 'donor-strand complemented' AfaE: the afimbrial adhesin from diffusely adherent *E. coli*. **J. Biomol. NMR.**, v. 29, p. 409-410, 2004.
- ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Microbiol Methods.**, v. 106, p.16-8, 2014.
- BANDO, S. Y.; ANDRADE, F. B.; GUTH, B. E.; ELIAS, W. P.; MOREIRA-FILHO, C. A.; PESTANA-DE-CASTRO, A. F. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli*

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 299, p. 22-30, 2009.

BANDO, S. Y.; MORENO, A. C.; ALBUQUERQUE, J. A.; AMHAZ, J. M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; MARTINEZ, M. B. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: a comparative study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 786-91, 2010.

BANERJEE, R.; JOHNSTON, B.; LOHSE, C.; CHATTOPADHYAY, S.; TCHESNOKOVA, V.; SOKURENKO, E. V.; JOHNSON, J. R. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, p. 5912-5917, 2013.

BAUDRY, B.; SAVARINO, S. J.; VIAL, P.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 1249-1251, 1990

BAUER, A. W.; KIRKY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 1539-1546, 1992.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE-BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III - encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4302-4311, 2012.

BERNSTEIN, H. D. Are bacterial 'autotransporters' really transporters? **Trends Microbiol.**, v. 15, p. 441-447, 2007.

BILGE, S. S.; CLAUSEN, C. R.; LAU, W.; MOSELEY, S. L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4281-4289, 1989.

BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C. F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C.; CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP OF WHO AND UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet.**, v. 375, p. 1969-1987, 2010.

BLASER, A. R.; DEANE, A. M.; FRUHWALD, S. Diarrhoea in the critically ill. **Curr. Opin. Crit. Care.**, v. 21, p. 142-153, 2015.

BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D. A.; REDMAN, J. C.; PERSSON, S.; SIMON, J.; KOTLOFF, K. L.; LEVINE, M. M.; SOW, S.; TAMBOURA, B.; TOURE, A.; MALLE,

D.; PANCHALINGAM, S.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J. Infect. Dis.**, v. 205, p. 431-444, 2012.

BOISEN, N.; RUIZ-PEREZ, F.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 294-301, 2009.

BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D. A.; REDMAN, J. C.; PERSSON, S.; SIMON, J.; KOTLOFF, K. L.; LEVINE, M. M.; SOW, S.; TAMBOURA, B.; TOURE, A.; MALLE, D.; PANCHALINGAM, S.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J. Infect. Dis.**, v. 205, p. 431-444, 2012.

BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 3281-3292, 2008.

BOLL, E. J.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; OLESEN, B.; STAHLHUT, S. G.; KROGFELT, K. A. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 81, p. 1164-1171, 2013.

BROOKS, J. T.; SOWERS, E. G.; WELLS, J. G.; GREENE, K. D.; GRIFFIN, P. M.; HOEKSTRA, R. M.; STROCKBINE, N. A. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. **J. Infect. Dis.**, v. 192, p. 1422-1429, 2005.

BRUMBAUGH, A. R.; MOBLEY, H. L. Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. **Expert. Rev. Vaccines.**, v. 11, p. 663-676, 2012.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R. E. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet.**, v. 365, p. 1147-1152, 2005.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. E.; 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.

CHATTAWAY, M. A.; JENKINS, C.; RAJENDRAM, D.; CRAVIOTO, A.; TALUKDER, K. A.; DALLMAN, T.; UNDERWOOD, A.; PLATT, S.; OKEKE, I. N.; WAIN, J. Enteroaggregative *Escherichia coli* have evolved independently as distinct complexes within the *E. coli* population with varying ability to cause disease. **PLoS One.**, v. 9, p. 11, 2014.

CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infect. Genet. Evol.**, v. 12, p. 214-226, 2012.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINO, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut. Microbes**, v. 3, p. 71-87, 2012.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4555–4558, 2000.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMOUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Env. Microbiol. Rep.**, v. 5, p. 58-65, 2013.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMOUR, E. Guide to various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, v. 161, p. 980-988, 2015.

COBELJIĆ, M.; MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ, B.; PAUNOVIĆ-TODOSIJEVIĆ, D.; VELICKOVIĆ, Z.; LEPSANOVIĆ, Z.; ZEC, N.; SAVIĆ, D.; ILIĆ, R.; KONSTANTINOVIĆ, S.; JOVANOVIĆ, B.; KOSTIĆ, V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 11-16, 1996.

COOKSON, S. T.; NATARO, J. P. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.**, v. 21, p. 421-434, 1996.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; 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.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 26–38, 2010.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 822-880, 2013.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **J. Infect.**, v. 71, p. 615-626, 2015.

DALLMAN, T. J.; CHATTAWAY, M. A.; COWLEY, L. A.; DOUMITH, M.; TEWOLDE, R.; WOOLDRIDGE, D. J.; UNDERWOOD, A.; READY, D.; WAIN, J.; FOSTER, K.; GRANT, K. A.; JENKINS, C. An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases associated with a large multi-pathogen foodborne outbreak in the UK. **PLoS One**, v. 9, p. 98-103, 2014.

DAUTIN, N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. **Toxins (Basel)**, v. 2, p. 1179-1206, 2010.

DAWSON, K. G.; EMERSON, J. C.; BURNS, J. L. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 18, p. 816-822, 1999.

DERAKHSHANDEH, A.; FIROUZI, R.; MOATAMEDIFAR, M.; MOTAMEDI, A.; BAHADORI, M.; NAZIRI, Z. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from human samples. **Mol. Biol. Res. Com.**, v. 2, p. 143–149, 2013.

DUDLEY, E. G.; ABE, C.; GHIGO, J. M.; LATOUR-LAMBERT; HORMAZABAL, J. C.; NATARO, J. P. An IncI1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 2102-2114, 2006a.

DUDLEY, E. G.; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MORIN, N. P.; NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 1267-1282, 2006b.

ELIAS JUNIOR, W. P. **Biogênese da fímbria AAF/II de *Escherichia coli* enteroagregativa.** 1999. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1999.

ELIAS, W. P.; SUZART, S.; TRABULSI, L. R.; NATARO, J. P.; GOMES, T. A. Distribution of *aggA* and *aafA* gene sequences among *Escherichia coli* isolates with genotypic or phenotypic characteristics, or both, of enteroaggregative *E. coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 597-599, 1999

ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA S. K.; TRABULSI L. R.; GOMES T. A. T. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhea **Epidemiol. Infect.**, v. 129, p. 49-55, 2002.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3155-3163, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 66, p. 281-298, 2012.

ESTRADA-GARCIA, T.; PEREZ-MARTINEZ, I.; BERNAL-REYNAGA, R.; ZAIDI, M. B. Enteroaggregative *Escherichia coli*: a pathogen bridging the North and south. **Curr. Trop. Med. Rep.**, v. 1, p. 88-96, 2014.

FALLARINO, A.; MAVRANGELOS, C.; STROEHER, U. H.; MANNING, P. A. Identification of additional genes required for O-antigen biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 2147-2153, 1997.

FIHN, S. D. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, p. 259–266, 2003.

FRÖMMEL, U.; BÖHM, A.; NITSCHKE, J.; WEINREICH, J.; GROß, J.; RÖDIGER, S.; WEX, T.; ANSORGE, H.; ZINKE, O.; SCHRÖDER, C.; ROGGENBUCK, D.; SCHIERACK, P. Adhesion patterns of commensal and pathogenic *Escherichia coli* from humans and wild animals on human and porcine epithelial cell lines. **Gut Pathog.**, v. 5, p. 31, 2013.

FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for biofilm formation. **Curr. Microbiol.**, v. 56, p. 474-480, 2008.

GEDEBJERGA, A.; HASMANB, H.; SØRENSENC, C. M.; WANGA, M. An OXA-48-producing *Escherichia coli* isolated from a Danish patient with no hospitalization abroad. **Infec. Dis.**, v. 47, p. 593-595, 2015.

GIOPPO, N. M.; ELIAS W. P.; VIDOTTO, M. C.; LINHARES, R. E.; SARIDAKIS, H. O.; GOMES, T. A.; TRABULSI, L. R.; PELAYO, J. S. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, p. 293-298, 2000.

GIRÓN, J. A.; JONES, T.; MILLÁN-VELASCO, F.; CASTRO-MUNOZ, E.; ZARATE, L.; FRY, J.; FRANKEL, G.; MOSELEY, S. L.; BAUDRY, B.; KAPER, J. B.; SCHOOLNIK, G. K.; RILEY, L. W. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 507-513, 1991.

GOMES, T. A.; ABE, C. M.; MARQUES, L. R. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. **J Clin Microbiol.**, v. 33, p. 33-64, 1995

GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; ABE, C. M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P. M.; RAMOS, S. R. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p.3609-3613, 1998.

GONZÁLEZ-CHAMORRO, F.; PALACIOS, R.; ALCOVER, J.; CAMPS, J.; BORREGO, F.; DÁMASO, D. Urinary tract infections and their prevention. **Actas. Urol. Esp.**, v. 36, p. 48-53, 2012.

GORDON, D. M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environ. Microbiol.**, v. 10, p. 2484–2496, 2008.

GUERRANT, R. L.; DEBOER, M. D.; MOORE, S. R.; SCHARF, R. J.; LIMA, A. A. The impoverished gut- a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 10, p. 220-229, 2013.

GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. T. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 53–66, 2000.

GUYER, D. M.; RADULOVIC, S.; JONES, F.E.; MOBLEY, H. L. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4539–4546, 2002.

HANNAN, T. J.; TOTSIKA, M; MANSFIELD, K. J.; MOORE, K. H.; SCHEMBRI, M. A.; HULTGREN, S. J. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, p. 616-648, 2012.

HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, p. 154-155, 2007.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GÖTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 1083-1091, 1996.

HEIMER, S. R.; RASKO, D. A.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; MOBLEY, H. L. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 593-597, 2004.

HENDERSON, I. R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F., NATARO, J. P. Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 692–744, 2004.

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

HERZER, P. J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAM, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single- stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriology**, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

HERZOG, K.; ENGELER, D. J.; HUGENTOBLE, M.; BEUTIN, L.; SÄGESSER, G.; STEPHAN R.; HÄCHLER, H.; NÜESCH-INDERBINEN, M. Diarrheagenic

enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. **Infection.**, v. 42, p. 441-444, 2013.

HICKS, S.; CANDY D. C.; PHILLIPS A. D.. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infect.Immun.**, v. 64, p. 4751-4760, 1996.

HUANG, D. B.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L.; KAMAT, P. P.; MHATRE, A. D.; OKHUUSEN, P. C.; CHIANG, T. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 556-563, 2006.

HUNT, J. M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **Clin. Lab. Med.**, v. 30, p. 21-45, 2010.

INGERSON-MAHAD, M.; REID, A. *E. coli*: good, bad & deadly. **American Academy of Microbiology**, p.1-13, 2011.

IRANPOUR, D.; HASSANPOUR, M.; ANSARI, H.; TAJBAKHSH, S.; KHAMISIPOUR, G.; NAJAFI, A. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, p. 1-7, 2015

ISIDEAN, S. D.; RIDDLE, M. S.; SAVARINO, S. J.; PORTER, C. K. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine**, v. 29, p. 6167-6178, 2011.

ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; EZAKI, T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable :H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2546-2550, 1997.

JOHNSON, J. R.; MURRAY, A. C.; GAJEWSKI, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPES, P.; KUSKOWSKI, M. A.; SMITH, K. E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 47, p. 2161-2168, 2003.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 295, p. 383-404, 2005.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extend virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 261-72, 2000.

JØNSSON, R.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; MATEIU, R. V.; SANTIAGO, A. E.; JENSSEN, H.; NATARO, J. P.; KROGFELT, K. A. A novel Aggregative Adherence Fimbriae (AAF/V) of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). **Infect. Immun.**, v. 83, p. 1396-1405, 2015

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p 130-133, 1996.

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

KEUSCH, G. T.; ROSENBERG, I. H.; DENNO, D. M.; DUGGAN, C.; GUERRANT, R. L.; LAVERY, J. V.; TARR, P. I.; WARD, H. D.; BLACK, R. E.; NATARO, J. P.; RYAN, E. T.; BHUTTA, Z. A.; COOVADIA, H.; LIMA, A.; RAMAKRISHNA, B.; ZAIDI, A. K.; BURGESS, D. C.; BREWER, T. Implications of acquired environmental enteric dysfunction for growth and stunting in infants and children living in low- and middle-income countries. **Food. Nutr. Bull.**, v. 34, p. 357-364, 2013.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A. S.; ZAIDI, A. K.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J. B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R. A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C. E.; MINTZ, E. D.; BERKELEY, L. Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R. M.; LEVINE, M. M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet.** v. 382 p. 209-22. 2013.

LANATA, C. F.; FISCHER-WALKER, C. L.; OLASCOAGA, A. C.; TORRES, C. X.; ARYEE, M. J.; BLACK, R. E.; CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION AND UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS One.**, v. 8, p.1-11, 2013.

LECOINTRE, G.; RACHDI, L.; DARLU, P.; DENAMUR, E. *Escherichia coli* Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. **Mol. Biol. Evol.**, v. 15, p. 1685-1695, 1998.

LEVINE, M. M.; XU, J. G.; KAPER, J. B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATARO, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **J Infect Dis.**, v. 156, p. 175-82, 1987.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** 2004. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 608 p.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, p. 712-719, 2012.

MELLMANN, A. M.; BIELASZEWSKA, R.; KOCK, A. W.; FRIEDRICH, A.; FRUTH, B.; MIDDENDORF, D.; HARMSEN, M. A.; SCHMIDT, H. K. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, p.1287-1290, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e controle da qualidade de água para consumo humano**. Ministério da saúde, 212 p. 2006)

MONTEIRO, B. T.; CAMPOS, L. C.; SIRCILI, M. P.; FRANZOLIN, M. R.; BEVILACQUA, L. F.; NATARO, J. P.; ELIAS, W. P. The dispersin-encoding gene (*aap*) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 65, p. 81-84, 2009

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.

MORA, A.; VISO, S.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M. P.; GARCÍA-GARROTE, F.; DABHI, G.; MAMANI, R.; HERRERA, A.; MARZOA, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; SCHOULER, C.; BLANCO, J. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. **Vet. Microbiol.**, v. 167, p. 506-512, 2013.

MORENO, A. C.; FERREIRA, K. S.; FERREIRA, L. G.; ALMEIDA, S. R.; MARTINEZ, M. B. Recognition of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* by dendritic cells: distinct dendritic cell activation states. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 107 p. 138-41. 2012.

MORENO, A. C.; FERREIRA, L. G.; MARTINEZ, M. B. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: how different patterns of gene expression affect virulence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 301, p. 156-163, 2009.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA-DE-CASTRO A. F. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 7399–7408, 2009.

NANDANWAR, N.; JANSSEN, T.; KÜHL, M.; AHMED, N.; EWERS, C.; WIELER L. H. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) of human and avian origin belonging to sequence type complex 95 (STC95) portray indistinguishable virulence features. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, p. 835-842, 2014.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W. C.; HEIMER, R., TIRRELL, S.; EDBERG, S. C.; BRADEN, C. R.; GLENN-MORRIS, J.; HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, p. 402-407, 2006

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 176, p. 4691-4699, 1994.

NATARO, J. P.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N.; LEVINE, M. M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 560-565, 1985.

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

NATARO, J. P.; YKANG, D.; YNGKANG, D.; WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4691-4699, 1994.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes.**, v. 2, p. 13-24, 2011.

NAZEMI, A.; MIRINARGASI, M.; MERIKHI, N.; SHARIFI, S. H. Distribution of pathogenic genes *aatA*, *aap*, *aggR*, among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and their linkage with *StbA* Gene. **Indian J. Microbiol.**, v. 51, p. 355–358, 2011.

NISHI, J.; SHEIKH, J.; MIZUGUCHI, K.; LUISI, B.; BURLAND, V.; BOUTIN, A.; ROSE, D. J.; BLATTNER, F. R.; NATARO, J. P. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 45680-45689, 2003.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 478-483, 2011.

OKEKE, I. N.; WALLACE-GADSDEN, F.; SIMONS, H. R.; MATTHEWS, N.; LABAR, A.S.; HWANG, J.; WAIN, J. Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. **PLoS One.**, v. 23, p. 14093, 2010.

OKHUYSEN, P. C.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 503-505, 2010.

OLESEN, B.; SCHEUTZ, F.; ANDERSEN, R. L.; MENARD, M.; BOISEN, N.; JOHNSTON, B.; HANSEN, D. S.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P.; JOHNSON, J. R. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, p.3703–3711, 2012.

PARHAM, N. J.; SRINIVASAN, U.; DESVAUX, M.; FOXMAN, B.; MARRS, C. F.; HENDERSON, I. R. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.15, p. 73-83, 2004

PARK, H. K.; JUNG, Y. J.; CHAE, H. C.; SHIN, Y. J.; WOO, S. Y.; PARK, H. S.; LEE, S. J. Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (*kps*, *usp* and *ireA*) and enteroaggregative genes (*aggR* and *aap*) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, v. 43, p. 51–57, 2009.

PETRI, W. A.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 1277-1290, 2008.

PICARD, B.; GARCIA, J. S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 546-553, 1999.

PITONDO-SILVA, A.; MINARINI, L. A.; CAMARGO, I. L.; DARINI, A. L. Clonal relationships determined by multilocus sequence typing among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 672-679, 2009

PITOUT, J. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Front. Microbiol.**, v. 19, p. 3-9, 2012.

PUPO, G. M.; LAN, R.; REEVES, P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 10567–10572, 2000.

RASKO, D. A.; WEBSTER, D. R.; SAHL, J. W.; BASHIR, A.; BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; PAXINOS, E. E.; SEBRA, R.; CHIN, C. S.; ILIOPOULOS, D.; KLAMMER A.; PELUSO, P.; LEE, L.; KISLYUK, A. O.; BULLARD, J.; KASARSKIS, A.; WANG, S.; EID, J.; RANK, D.; REDMAN, J. C.; STEYERT, S. R.; FRIMODT-MØLLER, J.; STRUVE, C.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P.; SCHADT, E. E.; WALDOR, M. K. Origins of the *Escherichia coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, p. 709-717, 2011.

RESTIERI, C.; GARRISS, G.; LOCAS, M. C.; DOZOIS, C. M. Autotransporter encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 1553–1562, 2007.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, p. 380–390, 2014.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JONHSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681-685, 1983.

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C. M.; MORELLI, A.; DE BATISTA, G. C. M. Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in brazilian infants. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 398-400, 2002.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 71, p. 745-770, 2014.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753–1754, 2000.

SABATÉ, M. ; MORENO, E. ; PÉREZ, T. ; ANDREU, A.; PRATS, G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clin. Microbiol. Infect.**,v. 12, p. 880– 886, 2006.

SAHL, J. W.; MATALKA, M. N.; RASKO, D. A. Phylomark, a tool to identify conserved 330 phylogenetic markers from whole-genome alignments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 4884- 4892, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SANTOS, A. C. M.; ZIDKO, A. C. M.; PIGNATARI, A. C.; SILVA, R. M. Assessing the diversity of the virulence potential of *Escherichia coli* isolated from bacteremia in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.46, p. 968-973, 2013

SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J. P.; SHEIKH, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K.; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p.133-139, 2004.

SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; MOLINA, J.; CRAVIOTO, A.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M.; FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 1019–1022, 1996.

SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTI, S. H.; CARVALHO, R. L.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, 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. A.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C. A.; CARVALHO, R. L.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence 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.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-536, 1984.

SCHEUTZ, F. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Microbiol. Spectr.**, v. 2, p. 1-15, 2014.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia castellani* and *Chalmers 1919*. Em: GARRITY, G.M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria Part B**. v. 2 p. 607-624. 2005.

SCHMIDT, H.; ZHANG, W. L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P. I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *sefC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6863–6873, 2001.

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, A.; CARNIEL, E.; HEESEMANN, J. Prevalence of the high-pathogenicity island of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 480-485, 1998.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. **Clin. Microb. Rev.**, v. 27, p. 823-869, 2014.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL'AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 983-997, 2001.

SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **Lancet**, v. 350, p. 814-815, 1997.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 4, p. 134-163, 2007.

SNELLING, A. M.; MACFARLANE-SMITH, L. R.; FLETCHER, J.N.; OKEKE, I.N. The commonly-used DNA probe for diffusely-adherent *Escherichia coli* cross-reacts with a subset of enteroaggregative *E. coli*. **BMC Microbiol.**, v. 21, p. 269, 2009.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56 p. 622–647 1992.

SPANO, L. C.; SADOVSKY, A. D. I.; SEGUI, P. N.; SAICK, K. E.; KITAGAWA, S. M. S.; PEREIRA, F. E. L.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 359-363, 2008.

STEINER, T. S.; NATARO, J. P.; POTEET-SMITH, C. E.; SMITH, J. A.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 1769-1777, 2000.

STINS, M. F.; BADGER, J. L.; KIM, K. S. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. **Microb. Pathog.**, v. 30, p. 19–28, 2001.

TAPIA-PASTRANA, G.; CHAVEZ-DUEÑAS, L.; LANZ-MENDOZA, H.; TETER, K.; NAVARRO-GARCÍA, F. VirK is a periplasmic protein required for efficient secretion of plasmid-encoded toxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 80, p. 2276-2285, 2012.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMOUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 207-217, 2010.

TOVAL, F.; KÖHLER, C. D.; VOGEL, U.; WAGENLEHNER, F.; MELLMANN, A.; FRUTH, A.; SCHMIDT, M. A.; KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; DOBRINDT, U. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, p. 407-418, 2013.

TRAMUTA, C.; ROBINO, P.; NUCERA, D.; SALVARANI, S.; BANCHE, G.; MALABAILA, A.; NEBBIA, P. Molecular characterization and antimicrobial resistance of faecal and urinary *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Italy. **Vet. Ital.**, v. 50, p. 23–30, 2014.

TURNER, S. M.; SCOTT-TUCKER, A.; COOPER, L. M.; HENDERSON, I. R. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, p. 10-20, 2006.

TZIPORI, S.; MONTANARO, J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; VIAL, P.; GIBSON, R. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 5302-5306, 1992.

ULETT, G. C.; TOTSIKA, M.; SCHAAL, K.; CAREY, A. J.; SWEET, M. J.; SCHEMBRI, M. A. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 16, p. 100-107, 2013.

UNHANAND, M.; MUSTAFA, M. M.; MCCRACKEN, G. H.; NELSON, J. D. Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. **J. Pediatr.**, v. 122, p. 15–21, 1993.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Ambient water quality criteria for bacteria. **United States Environmental Protection Agency**, Washington, DC. 1986.

VILLASECA, J. M.; NAVARRO-GARCÍA, F.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; NATARO, J. P.; CARVIOTO, A.; ESLACA, C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 5920-5927, 2000

VISWANATHAN, V.K.; HODGES, K.; HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhea. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 110-119, 2008.

WALLACE-GADSDEN, F.; JOHNSON, J. R.; WAIN, J.; OKEKE, I. N. Enteroaggregative *Escherichia coli* related to uropathogenic clonal group A. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, p. 757–760, 2007.

WANG, A.; NIZRAN, P.; MALONE, M.A.; RILEY, T. Urinary tract infections. **Prim. Care.**, v. 40, p.687-706, 2013.

WEI, J.; GOLDBERG, M. B.; BURLAND, V.; VENKATESAN, M. M.; DENG, W.; FOURNIER, G.; MAYHEW, G. F.; PLUNKETT, R. D.; ROSE, D. J.; DARLING, A.; MAU, B.; PERNA, N. T.; PAYNE, S. M.; RUNYEN-JANECKY, L. J.; ZHOU, S.; SCHWARTZ, D. C.; BLATTNER, F. R. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. **Infect. Immun.** v. 71, p. 2775–2786, 2003.

WHITTAM, T. S.; OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Geographic Components of Linkage Disequilibrium in Natural Populations of *Escherichia coli*. **Mol. Biol. Evol.**, v.1, p. 67-83, 1983.

WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L. H.; KARCH, H.; REEVES, P. R.; MAIDEN, M. C.; OCHMAN, H.; ACHTMAN, M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Mol. Microbiol.**, v. 60, p. 1136-1151, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoeal disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>>. Acesso em: 08 out. 2015.