

VANESSA BUERIS

**INTERAÇÃO DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)
ATÍPICA QUE APRESENTA O PADRÃO DE ADESÃO
LOCALIZADA-LIKE COM A CÉLULA EPITELIAL *IN VITRO***

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Jr.

São Paulo

2008

RESUMO

BUERIS, V. **Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica que apresenta o padrão de adesão localizada-like com a célula epitelial *in vitro***. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), um dos principais agentes causadores de diarreia infantil em países em desenvolvimento, pode ser classificada como EPEC típica ou atípica. A principal característica de sua patogênese é a formação da lesão “attaching and effacing” (A/E) no epitélio intestinal. A adesão de EPEC típica às células epiteliais é denominada adesão localizada (LA). Inicialmente, as bactérias aderem-se de maneira frouxa formando microcolônias compactas e, em seguida, ocorre a adesão íntima da bactéria à célula epitelial. As EPEC atípicas apresentam frequentemente o padrão de adesão localizada-like (LAL), no qual não se observa a formação das microcolônias compactas e que ocorre tardiamente em relação à LA. Este estudo teve como principal objetivo caracterizar a interação *in vitro* de amostras de EPEC atípica que apresentam o padrão LAL com a célula epitelial. A cinética comparativa da lesão A/E, analisada através do teste de detecção de acúmulo de actina polimerizada (teste de FAS), demonstrou claramente que existe um “atraso” na adesão e na formação da lesão em EPEC atípica. Este atraso correspondeu ao observado na expressão temporal dos fatores de virulência Intimina, Tir e EspA, envolvidos na formação da lesão A/E. Em EPEC típica, a expressão desses fatores se iniciou na primeira hora de interação, aumentando progressivamente até 6h; já em EPEC atípica os níveis de expressão observados com 3h em EPEC típica foram alcançados apenas após 5h de interação. A microscopia eletrônica de transmissão da lesão A/E de EPEC atípica demonstrou que após 3h um número pequeno de bactérias encontrava-se aderido e pôde-se observar a destruição das microvilosidades, porém, os pedestais encontravam-se muito pouco projetados ou até inexistentes, tornando-se mais evidentes apenas após 6h de interação. A complementação de EPEC atípica com o regulador *perABC* mostrou-se efetiva em adiantar não só a expressão de Intimina, Tir e EspA, como também a formação da lesão A/E. A presença de diferentes adesinas descritas em outros patótipos de *E. coli* diarreiogênica foi pesquisada e estas detectadas nas seguintes frequências: Efa/LifA – 100%, Iha – 30.7%, LPF - 38.3%, ToxB - 7.7% e Paa - 92%. As adesinas LDA e Saa não foram detectadas. Não foi observada nenhuma mobilização ou co-localização dos receptores eucarióticos Nucleolina e β 1-Integrina no foco de adesão bacteriana, mesmo em células epiteliais polarizadas. A análise da possível interação da Intimina com outros receptores da célula epitelial revelou a presença de um peptídeo de aproximadamente 300 kDa que parece interagir com essa adesina, porém, a elucidação desse provável receptor para Intimina necessita de estudos complementares.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Diarreia. Interação com célula epitelial *in vitro*.

ABSTRACT

BUERIS, V. **In vitro interaction of LAL-adherent atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with the epithelial cell.** 131 f. Thesis (Doctor in Sciences – Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), one of the main causes of infant diarrhea in the developing countries, can be classified as typical or atypical. The main feature of its pathology is the formation of the attaching and effacing (A/E) lesion on the intestinal epithelium. Typical EPEC exhibit a localized adherence (LA) pattern in epithelial cells culture, where tight bacterial clusters are produced. Atypical EPEC, on the other hand, produce a localized-like adhesion (LAL) pattern, in which the compact clusters are not formed and that occurs in a later stage of the infection. The aim of this study was to characterize the interaction of LAL-adherent atypical EPEC strains with the epithelial cell. The kinetics of the A/E lesion, analyzed through the FAS test, showed a clear delay in its formation by the atypical strains, when compared with the typical ones. This showed to be a consequence of the delay observed in the temporal expression of Intimin, Tir and EspA, some of the virulence factors involved in A/E formation. In typical EPEC, the expression of these factors began in the first hour of interaction and grew progressively until 6h. In atypical EPEC, only after 5h, the expression levels were similar to those observed with typical EPEC with 3h interaction. The transmission electron microscopy of the A/E lesion demonstrated that after 3h a small number of atypical EPEC was attached to the epithelial cell and the microvilli effacement could be observed. However, the pedestals were less projected or even absent at this time, becoming evident only after 6h of interaction. The complementation of atypical EPEC with the *perABC* regulator revealed to be effective in not only advancing the expression of Intimin, Tir and EspA, as well the formation of A/E lesion. The presence of different adhesins already described in other diarrheogenic *E. coli* pathotypes was detected in the following frequencies: Efa/LifA – 100%, Iha – 30.7%, LPF - 38.5%, ToxB - 7.7% e Paa - 92%. The LDA and Saa adhesins were not detected. The analysis of the possible interaction of Intimin with epithelial cell receptors showed the presence of a 300 kDa peptide that it seems to interact with this adhesin, however, the confirmation of this probable receptor for Intimin needs complementary studies.

Key words: *Escherichia coli*. Diarrhea. *In vitro* epithelial cell interaction.

1 INTRODUÇÃO

As doenças bacterianas infecciosas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade, particularmente entre crianças de países em desenvolvimento (COHEN, 2000), e a *Escherichia coli* é o agente etiológico de uma grande proporção dessas infecções (CLARKE, 2001).

As amostras de *Escherichia coli* associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e são classificadas em seis patótipos, considerando os seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O:H, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998). Esses patótipos de *E. coli* diarreio gênicas são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC). Embora essa classificação continue sendo amplamente empregada, tem sido demonstrado que algumas categorias incluem microrganismos distintos. Desta forma, as EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) passaram a constituir uma subcategoria de EHEC (KAPER; NATARO; MOBELEY, 2004).

As EPEC podem ser classificadas em típicas e atípicas, sendo que as típicas possuem o gene *eae* (“EPEC *attaching and effacing*”) e o plasmídeo EAF (“EPEC *adherence factor*”), e as atípicas possuem o gene *eae*, mas são desprovidas do plasmídeo EAF, além de poderem apresentar fatores de virulência adicionais (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Entre 1945 e 1965, as EPEC típicas eram freqüentemente relacionadas a surtos de diarreia nos países desenvolvidos. Em países em desenvolvimento estiveram associadas como o principal agente de diarreia aguda na infância por várias décadas (NATARO; KAPER, 1998). Hoje em dia, raramente são isoladas como agentes de diarreia endêmica, havendo prevalência de sorotipos de EPEC atípica (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado que o mesmo vem ocorrendo no

Brasil (FERNANDES-FILHO, 2004; GOMES et al., 2004; ROBINS-BROWNE et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; BUERIS et al., 2007; ARAUJO et al., 2007), posicionando as EPEC atípicas como patógenos emergentes. Em um estudo recente foram analisadas 4196 amostras fecais, das quais 1211 (28,9%) foram positivas para *E. coli*, sendo 189 pacientes sem diarreia (controles) e 1022 pacientes com diarreia (casos), revelando que 9,33% das amostras de DEC apresentaram apenas o gene *eae*, sendo caracterizadas como EPEC atípica, enquanto apenas 0,08% apresentaram *eae* e EAF, sendo, portanto, classificadas como EPEC típica (BUERIS et al., 2007).

A principal característica da patogênese de EPEC é a formação de uma lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada “attaching and effacing” (A/E), que resulta da adesão íntima da bactéria ao enterócito e promove a destruição das microvilosidades do epitélio, levando à polimerização da actina e ao rearranjo das proteínas do citoesqueleto, resultando na formação de estruturas semelhantes a um pedestal na membrana apical do enterócito, sobre o qual a bactéria encontra-se aderida (MOON et al., 1983). As proteínas envolvidas na formação da lesão A/E são codificadas por genes cromossômicos localizados em uma ilha de patogenicidade de 35 kb, denominada “locus of enterocyte effacement” (LEE). A região LEE de EPEC compreende cinco operons denominados LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4 e LEE 5.

Os operons LEE 1, LEE 2 e LEE 3 contêm genes que codificam componentes do sistema de secreção do tipo III e o gene *ler* (“LEE-encoded regulator”), que regula positivamente os genes localizados em LEE e alguns fora dessa região (ELLIOTT et al., 2000).

O operon LEE 5 codifica, entre outras, as proteínas Intimina e Tir. Intimina é uma importante proteína de membrana externa com função de adesina, responsável pela adesão íntima da bactéria à célula eucariótica. Uma vez aderida, promove o rearranjo dos feixes de actina logo abaixo do local da adesão, o que, juntamente com outras proteínas do citoesqueleto, leva à formação do pedestal (JERSE; KAPER, 1991; DONNENBERG; YU; KAPER, 1993). O receptor da intimina é a proteína Tir (“Translocated intimin receptor”), sintetizada e translocada pela bactéria (KENNY et al., 1997). Tir é uma proteína integral de membrana com uma estrutura em grampo, onde as porções carboxi e amino terminais localizam-se dentro da célula hospedeira, e

o “loop” extracelular entre os dois domínios transmembrânicos funciona como domínio de ligação com a intimina (De GRADO et al., 1999; HARTLAND et al., 1999; KENNY et al., 1999; LUO et al., 2000). Em EPEC típica, a interação Intimina/Tir desencadeia uma cascata de eventos que promovem a formação do pedestal característico da lesão A/E.

LEE 4 codifica as proteínas secretadas EspA, EspB, EspD e EspF, entre outras (ELLIOTT et al., 1998). A proteína EspA forma a subunidade de um filamento que estabelece contato, servindo de canal entre a bactéria e a célula hospedeira. Foi demonstrado que EspB, EspD e Tir são translocadas para a célula hospedeira através de EspA e que EspB e EspD formam um poro de translocação na membrana celular e participam da transdução de sinais (KENNY et al., 1997; KNUTTON et al., 1998; HARTLAND et al., 2000).

As EPEC típicas aderem às células epiteliais em um padrão de adesão denominado localizado (LA), no qual inicialmente, a bactéria se adere de maneira frouxa formando microcolônias compactas, provavelmente devido à participação da fímbria BFP (“Bundle-forming Pillus”) e do filamento formado pela proteína EspA e, em seguida, ocorre a adesão íntima da bactéria à célula epitelial, mediada pela proteína Intimina e seu receptor Tir (CLEARY et al., 2004). As EPEC atípicas apresentam o padrão de adesão localizada-*like* (LAL), no qual não se observa a formação das microcolônias compactas (SCALETSKY et al., 1999). Ao contrário do padrão LA, que pode ser observado após três horas de contato bactéria/célula eucariótica nos ensaios de adesão em células HEp-2, o padrão LAL é expresso apenas após seis horas de interação bactéria-célula epitelial. Não é conhecida a razão deste “atraso” na adesão bacteriana e consequentemente na formação da lesão A/E causada por EPEC atípica. Vários estudos têm demonstrado que amostras de EPEC atípica são capazes de apresentar além do padrão LAL os padrões de adesão agregativo, difuso e localizado (PELAYO et al., 1999; SCALETSKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; HERNANDES et al., 2008). A incapacidade de EPEC atípica aderir em células epiteliais cultivadas também tem sido relatada.

Estudos filogenéticos envolvendo EPEC típica, atípica e EHEC demonstraram que as EPEC atípicas são evolutivamente mais próximas de EHEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Assim, a análise das adesinas

envolvidas na adesão LAL das EPEC atípicas deve envolver, além da Intimina e EspA, outras adesinas já descritas para EHEC (TARR et al., 2000; BADEA et al., 2003; TATSUNO et al., 2003).

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que o receptor Tir seria o único capaz de interagir com a adesina Intimina. Porém, estudos recentes têm demonstrado a participação de receptores eucarióticos na interação Intimina/célula hospedeira, entre eles, β_1 -Integrina e Nucleolina (MUZAMOONS; KOUTSOURIS; HECHT, 2003; SINCLAIR; O'BRIEN, 2002).

A grande maioria dos estudos genotípicos, fenotípicos e estruturais de EPEC é realizada com amostras de EPEC típica. Assim, os estudos sobre EPEC atípicas são limitados, restringindo-se a caracterizações epidemiológicas, de determinação de sorotipos e da presença de fatores de virulência. Poucos trabalhos caracterizaram mecanismos moleculares de virulência das EPEC atípicas (PELAYO et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; SCALETSKY et al., 2005; BAI et al., 2007; HERNANDES et al., 2008; MOREIRA et al., 2008).

Uma vez que EPEC atípica é considerada um patógeno emergente e que EPEC típica praticamente foi extinta de nosso meio, faz-se importante a análise aprofundada do padrão de adesão LAL, envolvendo adesinas, receptores e a cinética de formação da lesão A/E, o que permitiria uma caracterização mais aprofundada da patogênese das EPEC atípicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um dos organismos mais conhecidos e, certamente, um dos mais bem estudados. Foi descrita em 1885, sob a denominação *Bacillus coli comune*, pelo médico alemão Theodore Escherich, que notou sua alta prevalência na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e o seu potencial de causar doenças quando inoculada em sítios extra-intestinais (ESCHERICH, 1885). Em 1919, após uma revisão da nomenclatura, foi renomeada para *Escherichia coli*, fazendo referência a seu descobridor.

Um dos primeiros gêneros bacterianos a colonizar o trato intestinal humano, a *E. coli* já pode ser identificada no primeiro ou segundo dia de vida e, após a colonização, permanece na microbiota intestinal até o fim da vida. Alguns estudos demonstraram que a composição de *E. coli* no intestino humano geralmente consiste de 3 ou 4 linhagens, sendo que uma delas é denominada residente, permanecendo no organismo hospedeiro por meses, e as outras são transitórias, e duram algumas semanas (SEARS, 1949).

A principal suspeita de que a *E. coli* podia causar infecção intestinal surgiu na década de 1920, quando o pediatra alemão Adam verificou que certos biotipos fermentativos de *E. coli*, denominados por ele de *Dyspepsie-Coli*, eram freqüentemente isolados de crianças com dispepsia e muito raros em crianças normais. Esses organismos foram subclassificados em seis grupos fermentativos diferentes, A1 a A6, sendo que os tipos predominantes em casos clínicos eram A1 e A4 (ADAM, 1923, 1927).

Observações semelhantes foram descritas por Goldschmidt (1933). Porém, o fato de *E. coli* estar normalmente presente no trato gastrointestinal de todos os mamíferos fez com que esses relatos não recebessem grande atenção, até que John Bray, na década de 1940, começou a descrever surtos de diarréia relacionados a tipos específicos de *E. coli*.

Bray em 1945 e Bray e Beaven 1948, relataram a associação de uma linhagem particular de *E. coli* com a diarréia infantil, que foi denominada *Bacterium coli neapolitanum*. Giles e Sangster (1948) e Giles, Sangster e

Smith (1949) descreveram dois tipos sorologicamente distintos de *Bacterium coli neapolitanum*, alfa e beta, que estariam associados à gastroenterite. Taylor, Powell e Wright (1949) denominaram essas linhagens de *Bacterium coli* D433 e amostras que foram descritas na Holanda foram denominadas *Escherichia coli bray*. Nesse período, várias epidemias de diarreia associadas à *E. coli* foram relatadas e, cada grupo que as identificava, dava um nome diferente à bactéria. Em 1949, Bray escreveu uma carta ao editor da British Medical Journal propondo que todas as descrições referiam-se ao mesmo organismo (BRAY, 1949).

A nomenclatura de *E. coli* começou a ser uniformizada a partir de 1950, quando o esquema de sorotipagem desenvolvido pelo bacteriologista dinamarquês Fritz Kauffmann para diferenciar amostras de *Salmonella enterica*, foi adaptado para tipar as cepas de *E. coli* (KAUFFMANN, 1947; KAUFFMANN; DUPONT, 1950). Assim, um isolado passou a ser distinguido do outro pelos seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e, quando presentes, os capsulares (K). Essa tipagem foi muito útil e demonstrou que as linhagens de *E. coli* associadas à epidemias de diarreia entre as décadas de 20 e 40 pertenciam a um número muito pequeno de sorogrupos O, particularmente O55 e O111 (NETER, 1951; RAPPAPORT; HENNIG, 1952; HINTON; MacGREGOR, 1958). Hoje são reconhecidos mais de 180 sorogrupos O de *E. coli*, que podem ser subclassificados em mais de 60 sorotipos O:H, possibilitando mais de 10.000 combinações. Porém, o número de sorotipos relacionados à diarreia ainda é muito restrito (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

No decorrer da evolução de *E. coli* vários eventos de transferência horizontal de genes foram relatados dando origem às linhagens que conhecemos hoje por comensal (não-patogênica) e patogênicas, que podem causar infecção urinária, meningite, sepse e gastroenterites.

2.2 Diarreia infecciosa

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000), a diarreia infecciosa é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de

2 milhões de mortes a cada ano, particularmente entre crianças abaixo de 5 anos de idade. Apesar de se assistir a uma diminuição da incidência e da gravidade da diarreia aguda, esta doença continua a ser responsável por uma elevada taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento. No Brasil, principalmente nas regiões norte e nordeste, a doença diarreica representa grande causa de morbidade e mortalidade infantil, refletindo as condições sócio-econômicas de nossa população (GUERRANT et al., 1983).

Os agentes infecciosos bacterianos mais freqüentes nos casos de diarreia são *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica*. A prevalência desses patógenos pode variar de acordo com a classe sócio-econômica, a localização geográfica, o tipo e o local da residência (urbano ou rural), a idade da população estudada e as estações do ano. Nas formas endêmicas de diarreia infantil, o patógeno bacteriano mais comumente associado é a *E. coli* (WHO, 2002).

2.3 *Escherichia coli* diarreio gênica

As *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC) são constituídas por diferentes patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que adere de forma difusa às células epiteliais (DAEC). A patogênese das infecções intestinais causada por DEC varia entre um patótipo e outro, uma vez que apresentam mecanismos de virulência específicos, causam manifestações clínicas distintas, apresentam aspectos epidemiológicos diferentes, pertencem a sorotipos O:H definidos, além de apresentarem tipos específicos de interação com células epiteliais in vitro (NATARO; KAPER, 1998).

2.3.1 EPEC

Desde sua descoberta na década de 40, as EPEC continuam sendo uma das principais causas de diarreia em países em desenvolvimento em crianças com idade inferior a 1 ano, contribuindo para a morte de milhões de crianças anualmente na Ásia, África e Américas (ALBERT et al., 1995; ALBERT, 1996;

TORRES et al., 2001). No Brasil, são responsáveis por mais de 30% dos casos de diarreia, sendo que os sorotipos O111ab:HNM, O111ab:H2 e O119:H6 são os mais prevalentes na cidade de São Paulo (TRABULSI et al., 1961; TOLEDO et al., 1983; GOMES et al., 1991). Levine et al. (1993) e Cravioto et al. (1996) reportaram dados semelhantes no Chile e no México. Nos países desenvolvidos, apesar da rara ocorrência de epidemias, as EPEC ainda estão associadas a casos esporádicos de diarreia (GERMANI et al., 1994; SMITH et al., 1996; GIAMMANCO et al., 1996). Estudos mais recentes realizados por Yatsunagi et al. (2002) mostraram que a participação das EPEC nos casos de diarreia no Japão parece ser mais significativa do que se imaginava.

O termo EPEC foi criado por Neter et al. (1955) há mais de 50 anos para diferenciar alguns sorotipos de *E. coli* constituídos por patógenos humanos “com um potencial particular de causar infecções entéricas e não extra-intestinais”. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as EPEC compreendem os seguintes sorogrupos clássicos de *E. coli*: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O158 (WHO, 1987). Hoje se sabe que esses sorogrupos compreendem amostras de EPEC típicas e atípicas, assim como outras categorias de DEC como, por exemplo, EAEC e EHEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

No ano de 1995, na cidade de São Paulo, Brasil, foi realizado o segundo Simpósio Internacional de EPEC. Nesta ocasião, as EPEC foram classificadas em típicas e atípicas (KAPER, 1996). As EPEC típicas foram definidas como amostras de *E. coli* diarreiogênicas que são capazes de formar uma lesão histopatológica característica no epitélio intestinal denominada “Attaching and Effacing” (A/E), possuem o gene *eae* (“EPEC attaching and effacing”), não expressam a toxina de Shiga (Stx) e possuem o plasmídeo EAF (“EPEC adherence factor”), que contém os genes que codificam a fímbria BFP (“Bundle-Forming Pilus”). Além disso, as amostras de EPEC típica não apresentam fatores de virulência adicionais, exceto amostras do sorotipo O86:H34, que produzem citotoxina letal distensora - CDT (GHILARDI, 1999), e amostras dos sorotipos O55:H6 e O127:H6, que expressam a toxina EAST-1 (“enteroaggregative *E. coli* heat-stable toxin”). Os principais sorotipos que

representam as EPEC típicas são O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6 e O142:H34.

As EPEC atípicas, por sua vez, possuem o gene *eae*, mas não são portadoras do plasmídeo EAF. Além disso, podem apresentar fatores de virulência adicionais, como expressão da toxina EAST-1 por amostras dos sorotipos O26:H11, O128ac:H2, O55:H7 e O119:H2 e produção de enterohemolisinas E-hly (“EHEC hemolysin”) por amostras dos sorotipos O111:H9, O26:H11, O111:H8 e O128:H2 (CAMPOS et al., 1994; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Foi também demonstrado que amostras do sorotipo O125:H6 apresentam padrão de adesão agregativa em células epiteliais (do VALE, 1998). Os principais sorotipos pertencentes aos antígenos O clássicos de EPEC são: O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125:H6, O128:H2 (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Por outro lado, uma grande diversidade de sorotipos não pertencentes aos sorogrupos clássicos é freqüentemente detectada em amostras de EPEC atípicas (VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; BLANCO et al., 2006).

2.4 Plasmídeo EAF

O plasmídeo EAF foi primeiramente descrito por Baldini et al. (1983), que demonstraram que a adesão localizada observada em EPEC era decorrente da presença de um plasmídeo de cerca de 60 MDa, inicialmente denominado pMAR2. Um fragmento críptico de 1 kb derivado desse plasmídeo foi selecionado como sonda genética para sua detecção e, indiretamente, para a detecção dos genes relacionados com a adesão localizada de EPEC (NATARO et al., 1985). Desde a sua descrição, a sonda EAF tem sido amplamente empregada na detecção de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Estudos realizados posteriormente confirmaram a presença de dois operons relacionados à patogênese de EPEC.

O operon *bfp*, constituído por 14 genes, codifica uma fimbria do tipo IV denominada BFP, organizada na forma de feixes (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991; STONE et al., 1996). Girón, Ho e Schoolnik (1991) demonstraram que BFP é responsável pela adesão localizada da bactéria à célula hospedeira. A

importância de BFP na patogênese de EPEC foi demonstrada por Bieber et al., (1998), que verificaram que um mutante em *bfpA*, que codifica a pilina dessa fímbria, foi menos virulento em ensaios com voluntários humanos. Em biópsias intestinais humanas mantidas em cultura, foi demonstrado por Hicks et al. (1998) que BFP está envolvida na formação de microcolônias tridimensionais resultantes da interação inter-bacteriana, mas não nos estágios iniciais da adesão de EPEC às células intestinais. Posteriormente, verificou-se que além do seu papel na formação de microcolônias no estágio inicial da adesão localizada, BFP atua na subsequente dispersão dessas microcolônias (KNUTTON et al., 1999).

O plasmídeo EAF apresenta também o operon *per*, que consiste de três ORFs (“open reading frames”), *perA*, *perB* e *perC* (GOMEZ-DUARTE; KAPER, 1995), e codifica um ativador transcricional denominado “plasmid encoded regulator” (Per). Mellies et al. (1999) demonstraram que PerA, proteína homóloga aos reguladores bacterianos da família AraC, ativa a expressão da Intimina e do gene plasmidial *bfpA*. Per também ativa a expressão do gene cromossômico *ler* (“LEE-encoded regulator”), disparando uma cascata de expressão e ativando os operons LEE 2, LEE 3, LEE 4 e LEE 5 (SPERANDIO et al., 2000).

2.5 Lesão “Attaching and Effacing” (A/E)

A lesão A/E, característica mais marcante da infecção por EPEC, foi primeiramente descrita por Moon et al. (1983). Esses autores analisaram amostras de EPEC isoladas de humanos sabidamente capazes de causar diarreia em voluntários, além de uma amostra isolada de coelhos, para verificar sua capacidade de aderir e destruir as microvilosidades do epitélio intestinal de porcos e coelhos. Foi demonstrado que as amostras humanas eram capazes de causar a lesão intestinal nos sistemas testados e decidiu-se fazer referência a elas com o termo “attaching and effacing *E. coli*” (AEEC).

Apesar de estudos anteriores terem reportado esta histopatologia, como aqueles realizados por Staley, Jones e Corley (1969) e Staley, Corley e Jones (1970), nos quais foi demonstrado que amostras de EPEC eram capazes de colonizar células epiteliais de porcos recém nascidos através de uma adesão

muito íntima e, ainda, causar a destruição das microvilosidades do epitélio intestinal, esse fenótipo, assim como o termo “attaching and effacing”, só se tornaram fortemente associados à EPEC após o artigo de Moon et al. (1983).

A lesão A/E resulta da adesão íntima da bactéria ao enterócito, o que promove a destruição das microvilosidades do epitélio e leva à polimerização dos filamentos de actina e ao rearranjo das proteínas do citoesqueleto, resultando na formação de estruturas semelhantes a um pedestal na membrana apical do enterócito. Essa lesão pode ser observada em mucosa intestinal de animais e seres humanos infectados natural ou experimentalmente, assim como em células epiteliais cultivadas (ROTHBAUM et al., 1982; KNUTTON et al., 1987; FINLAY et al., 1992).

Knutton et al. (1989), observando que a composição dos pedestais continha uma alta concentração de filamentos de actina polimerizada (F-actina), desenvolveram um teste muito utilizado na detecção de patógenos causadores da lesão A/E, denominado teste de FAS (“fluorescent-actin staining”). No teste de FAS a faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína se liga especificamente aos filamentos de actina polimerizada, evidenciando os locais de adesão bacteriana e dos pedestais. Antes do desenvolvimento desse teste, a lesão A/E podia ser visualizada apenas através de microscopia eletrônica de transmissão.

Monteiro-da-Silva et al. (1989), demonstraram que amostras do sorotipo O111:HNM eram capazes de formar agregados de actina no local da adesão utilizando um teste semelhante ao de FAS, que empregava faloidina marcada com o fluorocromo rodamina, como previamente descrito por Faulstich, Trischmann e Mayer (1983).

Finlay et al. (1992), analisando a composição da lesão A/E através de imunofluorescência, determinaram que outras proteínas do citoesqueleto, além da actina, estão envolvidas na constituição da lesão A/E. Ficou demonstrado que proteínas como a α -actinina, uma molécula envolvida na interligação dos filamentos de actina, assim como a talina e a ezerina, envolvidas na ligação dos filamentos de actina à proteínas transmembrânicas, também se localizavam nos locais de adesão bacteriana.

2.6 Região LEE

As proteínas envolvidas na formação da lesão A/E são codificadas por genes cromossômicos localizados em uma ilha de patogenicidade de 35 kb, denominada “locus of enterocyte effacement” (LEE). A região LEE não está presente em linhagens comensais de *E. coli*, em ETEC, EAEC ou DAEC, mas é encontrada em vários outros patógenos capazes de formar a lesão A/E, dentre os quais, EHEC, *Citrobacter rodentium*, amostras diarreiogênicas de *Hafnia alvei* e diversas amostras de *E. coli* associadas a diarreia e outras infecções entéricas em coelhos, porcos, bezerros e cachorros (NATARO; KAPER, 1998).

As ilhas de patogenicidade são regiões multigênicas do DNA cromossômico, provavelmente adquiridas horizontalmente no decorrer da evolução dos microrganismos, que codificam propriedades de virulência responsáveis pela diferenciação entre os organismos patogênicos e os não-patogênicos de uma mesma espécie (LEE, 1996). O conteúdo de G+C de LEE é de aproximadamente 38%, muito mais baixo do que o observado no genoma de *E. coli*, que é de 50 a 51%, fato que sugere que esta ilha de patogenicidade é proveniente de uma outra espécie bacteriana (ZHU et al., 2001).

McDaniel e Kaper (1997) demonstraram que a região LEE não apenas é necessária para a formação da lesão A/E, como também é suficiente para causá-la, uma vez que a transformação de LEE em uma *E. coli* K-12, não patogênica, foi capaz de conferir o fenótipo A/E a essa amostra.

A região LEE de EPEC compreende 41 ORF's organizadas em 5 operons principais, LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4 e LEE 5. Os operons LEE 1, LEE 2 e LEE 3 contêm genes que codificam componentes de um sistema de secreção do tipo III (genes *esc* e *sep*), e o gene *ler*, que regula positivamente os genes localizados em LEE e alguns fora dessa região (ELLIOTT et al., 2000). O operon LEE 5 codifica as proteínas Intimina, Tir e CesT. LEE 4 codifica proteínas secretadas Esp (“EPEC secreted protein”): EspA, EspB, EspD e EspF (ELLIOTT et al., 1998; SÁNCHEZ-SANMARTÍN et al., 2001).

Vários genes da região LEE são regulados *in trans* pelo ativador transcricional Per, codificado pelo plasmídeo EAF (GOMEZ-DUARTE; KAPER, 1995).

2.6.1 Sistema de Secreção do Tipo III

O sistema de secreção tipo III (SSTIII), encontrado em vários patógenos Gram-negativos, é altamente conservado entre as diferentes espécies. Acredita-se que tenha evoluído do sistema de biossíntese flagelar, uma vez que esses dois sistemas compartilham várias semelhanças genéticas, estruturais e funcionais (AIZAWA, 2001).

Jarvis et al. (1996) demonstraram que EPEC apresenta um SSTIII semelhante àqueles previamente descritos em *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* e *Yersinia* spp. Esses patógenos utilizam esse sistema para injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células eucarióticas, a fim de modular os processos celulares em seu próprio benefício, facilitando o processo de colonização e a patogênese.

Em EPEC, o SSTIII é composto por cerca de 20 proteínas diferentes, incluindo as proteínas efetoras, regulatórias, estruturais e as chaperoninas (HUECK, 1998; BLATTNER; BONAS, 2002). Para que as proteínas efetoras alcancem o citoplasma da célula hospedeira, uma estrutura protéica complexa denominada translocon, deve ser formada. Essa estrutura se assemelha a uma seringa e se estende desde a membrana interna da bactéria até o meio extracelular, formando um canal transmembrânico, através do qual, várias proteínas são secretadas (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). O “corpo” da seringa é constituído por várias proteínas, dentre as quais EscC e EscV, que são os componentes principais das estruturas em anel inseridas nas membranas externa e interna, respectivamente (GAUTHIER; FINLAY, 2003). EscJ é uma lipoproteína que parece atravessar o periplasma, servindo de ponte entre os anéis das membranas interna e externa (CREPIN et al., 2005). A “agulha” da seringa parece ser formada de uma única proteína, EscF, que é recoberta por filamentos da proteína EspA (WILSON et al., 2001). A proteína EspA forma a subunidade de um filamento que estabelece contato, servindo de canal entre a bactéria e a célula hospedeira (YIP et al., 2005). Recentemente demonstrou-se que EspB, EspD e Tir são translocadas para a célula hospedeira através de EspA e que EspB e EspD formariam um poro de translocação na membrana celular e participariam da transdução de sinais (KENNY et al., 1997; KNUTTON et al., 1998; HARTLAND et al., 2000).

Outras proteínas secretadas já foram descritas nos últimos anos e a participação delas na patogênese de EPEC ainda não está esclarecida. McNamara e Donnenberg (1998) demonstraram que EspF é capaz de promover alterações na permeabilidade das junções oclusivas da célula epitelial. A proteína Map (“mitochondrion-associated protein”), no estágio inicial da infecção de EPEC, parece ser responsável pela formação de uma estrutura semelhante a um filopódio no local da interação (KENNY et al., 2002). Além disso, Dean e Kenny (2004) demonstraram que Map desestabiliza a barreira intestinal e promove alterações na permeabilidade das junções oclusivas e que, apesar de Map e EspF estarem envolvidas na desestabilização da barreira intestinal, o fazem por mecanismos independentes. Shaw et al. (2005) demonstraram que EspG parece desestabilizar a rede de microtúbulos, interagindo com a tubulina. Também foi determinado que EspH se localiza no pedestal, mas seu papel ainda não foi definido (TU et al., 2003).

2.6.2 Intimina

Jerse et al. (1990) descreveram uma proteína de membrana externa de que seria indispensável para o fenótipo A/E. Essa proteína de 94kDa corresponde à adesina Intimina, codificada pelo gene *eae*, que é responsável pela aderência íntima da bactéria à célula do hospedeiro (JERSE; KAPER, 1991; DONNENBERG; YU; KAPER, 1993). Estudos posteriores demonstraram que a Intimina apresenta duas regiões funcionais, carboxi- e amino-terminais. A porção N-terminal, inserida na membrana externa da bactéria, seria responsável por mediar a dimerização da Intimina e é extremamente conservada entre diferentes amostras (TOUZE et al., 2004). A porção C-terminal, mais especificamente os últimos 280 aminoácidos (Int280), se estende para o meio externo para interagir com a célula hospedeira e é considerada variável, definindo os diferentes subtipos de Intimina (ADU-BOBIE et al., 1998). Através da utilização da técnica de PCR e de anticorpos específicos, já foi demonstrada a existência de inúmeros subtipos de Intimina, que são designados por letras do alfabeto grego (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000; ZHANG et al., 2002; TARR; WITTAN, 2002).

As EPEC típicas e atípicas apresentam diferenças com relação aos subtipos de Intimina. Enquanto a maioria das amostras de EPEC típica apresenta os subtipos α ou β Intimina (exceto amostras do sorotipo O86:H84), as EPEC atípicas apresentam os subtipos α , β ou γ Intimina, sendo que este último é encontrado em amostras de EHEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

2.6.3 Tir

Até pouco tempo, acreditava-se que o receptor da Intimina na célula epitelial fosse uma proteína eucariótica denominada Hp90, entretanto, demonstrou-se que seu receptor é uma proteína de 90 kDa secretada pela própria bactéria e translocada para o interior da célula hospedeira. Essa proteína, denominada Tir, foi descrita em EPEC por Kenny et al. (1997), que observaram que, após ser translocada, Tir é fosforilada e se insere na membrana da célula hospedeira. A mesma proteína foi descrita na amostra O26:HNM de EHEC como EspE (DEIBEL et al., 1998).

Experimentos de análise topológica e de seqüenciamento demonstraram que Tir é uma proteína integral de membrana com uma estrutura em grampo, onde as porções carboxi- e amino-terminais localizam-se dentro da célula hospedeira, e a alça extracelular entre os dois domínios transmembrânicos funciona como domínio de ligação para a Intimina (de GRADO et al, 1999; HARTLAND et al., 1999).

Da mesma maneira que a Intimina, Tir forma um dímero na membrana da célula hospedeira (LUO et al., 2000). A ligação dos dímeros de Intimina e Tir forma uma rede de ligação abaixo da bactéria, formando a adesão íntima (CAMPELLONE; LEONG, 2003). As porções N- e C-terminais interagem com proteínas do citoesqueleto conectando a bactéria, que está no exterior da célula, diretamente com o citoesqueleto da célula hospedeira (GOOSNEY; DeVINNEY; FINLAY, 2001). Essa interação leva à formação dos pedestais abaixo da bactéria. Em EPEC, após a translocação Tir é fosforilada no resíduo de tirosina 474, fato crucial para promover a polimerização dos filamentos de actina (KENNY et al., 1999).

2.6.4 EspA

A proteína secretada EspA foi descrita por Kenny et al. (1996) como uma proteína necessária para induzir a sinalização na célula epitelial decorrente da infecção por EPEC. Posteriormente foi demonstrado que EspA não estaria envolvida na transdução de sinais, e sim, seria uma proteína estrutural e o principal componente do sistema de secreção das proteínas envolvidas na lesão A/E (KNUTTON et al., 1998).

EspA forma um filamento longo e oco através do qual proteínas efetoras são translocadas para a célula hospedeira. De fato, na ausência de EspA, as proteínas EspB e Tir deixam de ser translocadas para a célula hospedeira (KNUTTON et al., 1998), demonstrando tratar-se de uma proteína essencial para que amostras de EPEC sejam capazes de expressar sua patogênese e formar a lesão A/E.

EspA é uma proteína de 25 kDa codificada pelo gene *espA* localizado no operon LEE3. A seqüência de nucleotídeos do gene *espA* de diferentes amostras de EPEC apresenta uma identidade de pelo menos 65% (NEVES et al., 1998). Já a análise da seqüência de aminoácidos da proteína EspA revelou uma similaridade à seqüência da Flagelina na porção C-terminal, região com alta probabilidade de adquirir a conformação *coiled-coil* (PALLEN; DOUGAN; FRANKEL, 1997). Sabe-se que inúmeras proteínas eucarióticas que apresentam estrutura filamentosa são baseadas na interação entre domínios *coiled-coil* (PARRY; STEINERT, 1992). Delahay et al. (1999) realizaram ensaios de complementação da amostra mutante UMD872 com o plasmídeo pMSD2, contendo o gene *espA* funcional, e mutagênese sítio-dirigida. Estes pesquisadores demonstraram que a substituição de resíduos específicos da seqüência de aminoácidos na região considerada crítica na conformação *coiled-coil*, tem conseqüências dramáticas na formação do filamento de EspA e na subversão das vias de sinalização na célula hospedeira que leva à formação da lesão A/E.

Recentemente, Crepin et al. (2005) investigaram a montagem do filamento de EspA e a translocação de proteínas efetoras através da parede celular bacteriana. Foi demonstrado que subunidades de EspA recém sintetizadas são incorporadas na ponta do filamento, da mesma forma que

acontece com o flagelo, e que o comprimento do filamento é modulado pela disponibilidade de subunidades intracelulares de EspA. Além disso, foi relatada a primeira evidência experimental de que as proteínas passam através do filamento oco de EspA antes de serem liberadas pela bactéria.

Como mencionado anteriormente, porção C-terminal da proteína EspA provavelmente está envolvida na interação entre as subunidades protéicas para formar a estrutura filamentosa, através dos domínios *coiled-coil* (PALLEN; DOUGAN; FRANKEL, 1997). Muito recentemente, Singh et al. (2008) demonstraram que a região N-terminal de EspA tem papel importante na estabilidade da proteína, além de estar envolvida na interação com a cheperonina CesAB e na biogênese e função do filamento.

2.7 Interação de EPEC com a célula epitelial

Um passo inicial importante na colonização do trato gastrointestinal humano pelas bactérias é a adesão do organismo na superfície da mucosa do hospedeiro. Embora a adesão seja essencial para manter os membros da microbiota normal do intestino, é também a fase inicial crítica em todas as infecções causadas por linhagens de *E. coli* patogênicas (TORRES et al., 2005).

2.7.1 Adesão Localizada

A adesão das EPEC típicas a células epiteliais, denominada adesão localizada (LA), ocorre em dois estágios. Inicialmente, a bactéria se adere à mucosa intestinal formando microcolônias (“clusters”), provavelmente devido a participação da fímbria BFP e do filamento formado pela proteína EspA. Girón, Ho e Schoolnik (1991) descreveram que a fímbria BFP era o fator que mediava a adesão localizada apresentada por EPEC. Posteriormente, Cleary et al. (2004) demonstraram que EspA poderia participar dessa adesão inicial. Em seguida, ocorre a adesão íntima da bactéria à célula epitelial mediada pela proteína Intimina.

2.7.2 Adesão Localizada-*like*

As EPEC atípicas apresentam um padrão de adesão denominado adesão localizada-*like* (LAL), no qual não se observa a formação de “clusters” bacterianos (SCALETSKY et al., 1999). Ao contrário do padrão LA, que pode ser observado após três horas de contato bactéria-célula eucariótica em ensaios de adesão com células HEp-2, o padrão LAL aparece apenas após seis horas. Não se sabe o que causa este “atraso” na adesão bacteriana. Sabe-se que o fenótipo LA é dependente da presença do plasmídio EAF e que este não está presente em EPEC atípica. Assim, a ausência de BFP pode estar relacionada a este fato, uma vez que esta fímbria está envolvida nos passos iniciais da colonização do epitélio intestinal (CLEARY et al., 2004). Além disso, a ausência do regulador Per poderia estar retardando a expressão de alguns genes de LEE envolvidos na adesão e formação da lesão A/E.

Estudos têm demonstrado que amostras de EPEC atípicas são capazes de apresentar, além do padrão LAL, os padrões de adesão agregativa, difusa, localizada, além de algumas amostras se mostrarem incapazes de aderir em células epiteliais *in vitro* (VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; HERNANDES et al., 2006).

2.7.3 Interação Intimina/Tir

A adesão de EPEC às células epiteliais induz uma variedade de vias de sinalização na célula eucariótica, envolvendo a fosforilação de várias proteínas em resíduos de serina e tirosina. A interação Intimina/Tir desencadeia uma cascata de eventos que promovem a formação de um pedestal na membrana apical do enterócito, característico da lesão A/E. Uma vez introduzida na célula hospedeira, Tir de EPEC é fosforilada por tirosina-quinases celulares em seu resíduo de tirosina 474, localizado na porção C-terminal, o que permite a ligação à proteína adaptadora Nck. Nck recruta a proteína N-WASP (“neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein”), que por sua vez, ativa o complexo protéico Arp2/3 (“actin-related protein 2/3”), estimulando o rearranjo de proteínas do citoesqueleto, como α -actinina, ezerina, cortactina, talina, entre outras, o que leva à polimerização dos filamentos de actina que formam o pedestal

(NOUGAYRÈDE et al., 2003). A ativação da polimerização de actina pode também ocorrer independentemente da ligação à Nck, apenas pela fosforilação dos resíduos de tirosina 454 e 474 (CAMPELLONE; LEONG, 2005).

Diferentemente, a proteína Tir de EHEC não apresenta o resíduo de tirosina 474 e, portanto, não é fosforilada. Além disso, a região de ligação de Nck em amostras de EHEC não é bem conservada. Aparentemente, o recrutamento de N-WASP que dispara a formação do pedestal na infecção por esse patótipo é realizado por uma proteína efetora denominada TccP (“Tir-cytoskeleton coupling protein”), não codificada por LEE, que faz o papel de Nck (CAMPELLONE; LEONG, 2003; LOMMEL et al., 2004). Além de EHEC O157:H7, o gene *tccP* foi detectado em amostras de EPEC típica e atípica e de outros sorotipos de EHEC (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005), indicando a presença da via de ativação de actina independente de Nck em EPEC. De fato, algumas amostras de EPEC, além da via de ativação dependente de Nck, podem utilizar a via TccP/TccP2, resultando no recrutamento direto de N-WASP que leva à polimerização de actina (WHALE et al., 2007). Recentemente, Bai et al. (2007) demonstraram que amostras de EPEC atípica do sorotipo O125:H6 são capazes de causar a lesão A/E em mucosa intestinal, mas não utilizam as vias de ativação da polimerização de actina através de Nck e/ou TccP/TccP2, utilizando uma via alternativa não conhecida.

Até muito pouco tempo acreditava-se que Tir era o único receptor para a Intimina. Porém, estudos recentes têm demonstrado a participação de receptores eucarióticos na interação Intimina/célula hospedeira. Muza-Moons; Koutsouris e Hecht (2003) demonstraram que a Intimina possui sítios de ligação para a β_1 -Integrina, uma proteína que se localiza na região basolateral da célula eucariótica. A infecção pela EPEC típica E2348/69 (sorotipo O127:H6) em células epiteliais polarizadas T84 causa alterações na barreira das junções oclusivas, responsável pela manutenção da polaridade celular, assim, há uma redistribuição das proteínas celulares e proteínas como a β_1 -Integrina, antes restritas à porção basolateral da célula, podem migrar para a superfície apical e interagir com a Intimina. Também foi demonstrado que a Intimina γ de EHEC O157:H7 interage com outra proteína eucariótica, a

Nucleolina, no modelo de adesão em células epiteliais HEP-2 (SINCLAIR; O'BRIEN, 2002).

Estudos filogenéticos envolvendo amostras de EPEC típica e atípica e de EHEC demonstraram que as EPEC atípicas são evolutivamente mais próximas de EHEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Desta forma, é possível que outras adesinas descritas em outros patótipos de DEC, principalmente em EHEC, como Iha (TARR et al., 2000), Efa1 (BADEA et al., 2003) e ToxB (TATSUNO et al., 2003), estejam presentes em EPEC atípica e possam estar envolvidas no padrão LAL. Além disso, a análise da interação dessas adesinas com diferentes receptores e a melhor caracterização do padrão de adesão das EPEC atípicas seriam uma grande contribuição para o melhor entendimento da patogênese desses microrganismos.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados anteriormente, foi possível concluir que:

* O fenótipo LAL, apresentado por amostras de EPEC atípica pertencentes aos sorotipos clássicos de EPEC, se mantém em outros tipos celulares *in vitro*, como as linhagens intestinais Caco-2 e T84.

* Os ensaios de FAS e MET demonstraram claramente um atraso na adesão de EPEC atípica em células epiteliais e também na formação da lesão A/E, quando comparados a amostras de EPEC típica.

* Em EPEC atípica, a expressão de alguns dos principais fatores de virulência (Intimina, Tir e EspA) ocorrem com atraso se comparados com EPEC típica.

* A presença do regulador Per, transformado na amostra de EPEC atípica O55:H7 (LB-7), foi capaz de antecipar a expressão de Intimina, Tir e EspA, assim como a formação de A/E em EPEC atípica.

* Na coleção de EPEC atípica analisada não foi encontrada nenhuma adesina já descrita em outros patótipos de DEC, que apresentasse alguma relação direta com padrão LAL.

* A adesina Intimina de EPEC atípica não foi capaz de interagir com os receptores eucarióticos Nucleolina e β 1-Integrina, mas apresentou interação *in vitro* com um peptídeo de aproximadamente 300 KDa, que ainda está por ser identificado.

REFERÊNCIAS*

ADAM, A. Über die Biologie der Dyspepsiecoli und Ihre Beziehungen zur Pathogenese der Dyspepsie und Intoxikation. **Jb. Kinderheilk.**, v. 51, p. 295-315, 1923.

ADAM, A. Dyspepsie-koli. Zur Frage der bakteriellen Aetiologie der sogenannten aliementaren Intoxikation. **Jb. Kinderheilk.**, v. 116, p. 8-40, 1927.

ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONÇALVES, A.G.; TRABULSI, L.R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins α , β , γ and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 662-668, 1998.

AFSET, J.E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSON, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 3703-3711 2006.

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

AIZAWA, S. Bacterial flagella and type III secretion systems. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 202, p. 157-164, 2001.

ALBERT, M.J.; FARUQUE, S.M.; FARUQUE, A.S.G.; NEOGI, P.K.B.; ANSARUZZAMAN, M.; BHUIYAN, N.A.; ALAM, K.; AKBAR, M.S. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 973-977, 1995.

ALBERT, M.J. Epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in Bangladesh. **Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 17-20, 1996.

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

* De acordo com:

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

BADEA, L.; DOUGHTY, S.; NICHOLLS, L.; SLOAN, J.; ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E.L. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Microb. Pathog.**, v. 34, p. 205–215, 2003.

BAI, L.; SCHÜLLER, S.; WHALE, A.; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L.; OOKA, T.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; KAPER, J.B.; GOMES, TAT; XU, J.; PHILLIPS, A.D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 361-368, 2007.

BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; CANDY, D.C.A.; MOON, H.W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 2, p. 534-538, 1983.

BATISSON, I.; GUIMOND, M.P.; GIRARD, F.; AN, H.; ZHU, C.; OSWALD, E.; FAIRBROTHER, J.M.; JACQUES, M.; HAREL, J. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of the attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4516-4525, 2003.

BEUTIN, L.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Zentrallbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg.**, v. 267, p. 576-588, 1988.

BIEBER, D.; RAMER, S.W.; WU, C.Y.; MURRAY, W.J.; TOBE, T.; FERNANDEZ, R.; SCHOLLNIK, G.K. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 280, p. 2114-2118, 1998.

BILGE, S.M.; 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.

BIRNBOIM H.C.; DOLLY J. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl. Acids Res.**, v. 7, p. 1515-1523, 1979.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; COIRA, M.A.; MADRID, C.; JUÁREZ, A.; BERNÁRDEZ, M.I.; GONZÁLEZ, E.A.;

BLANCO, J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Int. Microbiol.**, v. 9, p. 103-110, 2006.

BLATTNER, D.; BONAS, U. Port of entry – the type III secretion translocon. **TRENDS Microbiol.**, v. 4, p. 186-192, 2002.

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

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bacterium coli neapolitanum* from summer diarrhea of infants. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 57, p. 239-247, 1945.

BRAY, J. Strains of Bact. coli. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 386, 1949.

BRAY, J.; BEAVAN, T.E.D. Slide Agglutination of *Bacterium coli* var. *Neapolitanum* in Summer Diarrhoea. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 60, p. 395-401, 1948.

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

CAMPELLONE, K.G.; LEONG, J.M. Tails of two Tirs, p. actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 **Current Opinion Microbiol.**, v. 6, p. 82–90, 2003.

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

CAMPOS, L.C.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 545-552, 2004.

CANIL, C.; ROSENSHINE, I.; RUSCHKOWSKI, S.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* Decreases the Transepithelial Electrical Resistance of Polarized Epithelial Monolayers. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 2755-2762, 1993.

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

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

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, p. 762-767, 2000.

CRAVIOTO, A.; MOLINA, J.; MANJARREZ, A.; ESLAVA, C. The Mexican experience. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 21-24, 1996.

CREPIN, V.F.; SHAW, R.; ABE, C.M.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 2881-2889, 2005.

CREPIN, V. F.; PRASANNAN, S.; SHAW, R.K.; WILSON, R.K.; CREASEY, E.; ABE, C.M.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G.; MATTHEWS, S. Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 1658-1670, 2005.

DeGRADO, M.; ABE, A.; GAUTHIER, A.; STEELE-MORTIMER, O.; DeVINNEY, R. Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 1, p. 7-17, 1999.

DEAN, P.; KENNY, B. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 665-675, 2004.

DEIBEL, C.; KRAMER, S.; CHAKRABORTY, T.; EBEL, F. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 463–474, 1998.

DELAHAY, R.M.; KNUTTON, S.; SHAW, R.K.; HARTLAND, E.L.; PALLAN, M.J.; FRANKEL, G. The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 35969-35974, 1999.

DIAS, A.M.G. **Características de virulência e análise clonal de *Escherichia coli* do sorogrupo O128**. Tese (Doutor em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

do VALLE, G.R.F. **Propriedades de virulência de *Escherichia coli* dos sorogrupos O125 e O126**. Tese (Doutor em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4310-4317, 1991.

DONNENBERG, M.S.; YU, J.; KAPER, J.B. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 4670-4680, 1993.

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

ELIAS, W.P.; BARROS, S.F.; MOREIRA, C.G.; TRABULSI, L.R.; GOMES, T.A.T. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains among classical Enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroups. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 1-4, 2002.

ELLIOTT, S.J.; WAINWRIGHT, L.; McDANIEL, T.K.; McNAMARA, B.P.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. The complete sequence of locus of

enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 1-4, 1998.

ELLIOTT, S.J.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J.A.; SHIN, S.; MELLIES, J.L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S.W.; McDANIEL, T.K.; KAPER, J.B. The locus of enterocyte effacement (LEE)- encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6115-6126, 2000.

ESCHERICH, T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. **Fortschr. d. Med.**, v. 3, p. 515-522, 1885.

FAULSTICH, H.; TRISCHMANN, H.; MAYER, D. Preparation of tetramethylrhodaminy-phalloidin and uptake of the toxin into short-term cultured hepatocytes by endocytosis. **Exp. Cell. Res.**, v. 144, p. 73-82, 1983.

FERNANDES-FILHO, A. **Doença diarréica aguda em João Pessoa: prevalência de enteropatógenos e importância dos potenciais fatores de risco e proteção.** Tese (Doutor em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FINLAY, B.B.; ROSENSHINE, I.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2541-2543, 1992.

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

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

GARMENDIA, J.; REN, Z.; TENNANT, S.; MIDOLLI-VIERA, M.A.; CHONG, Y.; WHALE, A.; AZZOPARDI, K.; DAHAN, S.; SIRCILI, M.P.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R.; PHILLIPS, A.; GOMES, T.A.; XU, J.; ROBINS-BROWNE, R.; FRANKEL, G. Distribution of *tccP* in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5715-5720, 2005.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V.F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2573-2385, 2005.

GAUTHIER, A.; FINLAY, B.B. Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 6747–6755, 2003.

GERMANI, Y.; MORILLON, M.; BEGAUD, E.; DUBOURDIEU, H.; COSTA, R.; THEVENON, J. Two-year study of endemic enteric pathogens associated with acute diarrhea in New Caledonia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1532-1536, 1994.

GHILARDI, A.C.; GOMES, T.A.; ELIAS W.P.; TRABULSI, L.R. Virulence factors of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O127 and O142. **Epidemiol. Infect.**, v. 131, p. 815-821, 2003.

GHILARDI, A.C.R. **Características de virulência e análise clonal de amostras de *Escherichia coli* dos sorogrupos O142, O127 e O86.** Tese (Doutor em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

GIAMMANCO, A.; MAGGIO, M.; GIAMMANCO, G.; MORELLI, R.; MINELLI, F.; SCHEUTZ, F.; CAPRIOLI, A. Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 689-694, 1996.

GILES, C.; SANGSTER, G. Outbreak of Infantile Gastro-enteritis in Aberdeen, p. Association of Special Type of *Bact. coli* with Infection. **J. Hyg.**, v. 46, p. 1-9, 1948.

GILES, C.; SANGSTER, G.; SMITH, J. Epidemic Gastro-Enteritis of Infants in Aberdeen During 1947. **Arch. Dis. Childhood**, v. 24, p. 45-53, 1949.

GIRON, J.A.; HO, A.S.Y.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, p. 710-713, 1991.

GIRON, J.A.; TORRES, A.G.; FREER, E.; KAPER, J.B. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 361-379, 2002.

GOLDSCHMIDT, R. Untersuchungen zur Ätiologie der Durchfallserkrankungen des Säulings. **Jb. Kinderheilk.**, v. 139, p. 318-385, 1933.

GOMES, T.A.T.; RASSI, U.; MACDONALD, K.L.; RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C.; CANDEIAS, J.A.N.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R.F.; BLAKE, P.A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 331-337, 1991.

GOMES, T.A.; IRINO, K.; GIRÃO, D.M.; GIRÃO, V.B.; GUTH, B.E.; VAZ, T.M.; MOREIRA, F.C.; CHINARELLI, S.H.; VIEIRA, M.A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg Infect Dis.**, v. 10, p. 1851-1855, 2004.

GÓMEZ-DUARTE, O.G.; KAPER, J.B. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1767-1776, 1995.

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

GOOSNEY, D. L.; DEVINNEY, R.; FINLAY, B.B. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3315–3322, 2001.

GUERRANT, R.L.; KIRCHHOFF, L.V.; SHIELDS, D.S.; NATIONS, M.K.; LESLIE, J.; DE SOUSA, M.A.; ARAUJO, J.G.; CORREIA, L.L.; SAUER, K.T.; MCCLELLAND, K.E.; ET AL. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J. Infect. Dis.**, v. 148, p. 986-997, 1983.

HAACK, K.R.; ROBINSON, C.L.; MILLER K.J.; FOWLKES, J.W.; MELLIES, J.L. Interaction of Ler at the LEE5 (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 384-392, 2003.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-580, 1983.

HARTLAND, E.L.; BATCHELOR, M.; DELAHAY, R.M.; HALE, C.; MATTHEUS, S.; DOUGAN, G.; KNUTTON, S.; CONNERTON, I.; FRANKEL, G. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 151-158, 1999.

HARTLAND, E.L.; DANIELL, S.J.; DELAHAY, R.M.; NEVES, B.C.; WALLIS, T.; SHAW, R.K.; HALE, C.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. **Mol. Microbiol.**, v. 35 (6), p. 1483-1492, 2000.

HERNANDES, R.T.; VIEIRA, M.A.; CARNEIRO, S.M.; SALVADOR, F.A.; GOMES, T.A. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 4214-4217, 2006.

HERNANDES, R.T.; SILVA, R.M.; CARNEIRO, S.M.; SALVADOR, F.A.; FERNANDES, M.C.D.C.; PADOVAN, A.C.; YAMAMOTO, D.; MORTARA, R.A.; ELIAS, W.P.; BRIONES M.R.S.; GOMES T.A.T. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cell. Microbiol.**, v. 10, p. 415-425, 2008.

HICKS, S.; FRANKEL, G.; KAPER, J.B.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A.D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. **Infect Immun.**, v. 66, p. 1570-1578, 1998.

HINTON, N.A.; MacGREGOR, R.R. A study of infections due to pathogenic serogroups of *Escherichia coli*. **Canad. MAJ.**, v. 79, p. 359-364, 1958.

HUECK, C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 379-433, 1998.

JARVIS, K.G.; GIRÓN, J.A.; JERSE, A.E.; MCDANIEL, T.K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* Contains a Putative Type III Secretion System Necessary for the Export of Proteins Involved in Attaching and Effacing Lesion Formation. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 92, p. 7996-8000, 1995.

JENKINS, C.; SMITH, H.R.; LAWSON, A.J.; WILLSHAW, G.A.; CHEASTY, T.; WHEELER, J.G.; TOMPKINS, D.S. Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*

isolated in England from 1993 to 1996. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 25, p. 19-24, 2006.

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

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

KAPER, J.B. Defining EPEC. Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130–133, 1996.

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

KAUFFMANN F. Supplement to the paper Zur Serologie der Dysenterie-Gruppe. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 25, p. 619, 1948.

KAUFFMANN, F.; DUPONT, A. *Escherichia* Strains from Infantile Epidemic Gastro-Enteritis. **Acta Path. Microbiol. Scandinav.**, v. 27, p. 552-564, 1950.

KENNY, B.; LAI, L.; FINLAY, B.B.; DONNENBERG, M.S. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 313–324, 1996.

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

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

KENNY, B.; ELLIS, S.; LEARD, A.D.; WARAWA, J.; MELLOR, H.; JEPSON, M.A. Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by

multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 1095–1107, 2002.

KLAPPROTH, J.M.A.; SCALETSKY, I.C.A.; MCNAMARA, B.P.; LAI, L-C.; MALSTROM, C.; JAMES, S.P.; DONNENBERG, M.S. A Large Toxin from Pathogenic *Escherichia coli* Strains that Inhibits Lymphocyte Activation. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2148-2155, 2000.

KNUTTON, S.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; McNEISH, A.S. Role of plasmid-encoded factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 78-85, 1987.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P.H., V. MCNEISH, A.S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells, p. basis of new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1290-1298, 1989.

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

KNUTTON, S.; SHAW, R.K.; ANANTHA, R.P.; DONNENBERG, M.S.; ZORGANI, A.A. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 499-509, 1999.

LEAMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE C.A. Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. **Infect. Agents Dis.**, v. 5, p. 1-7, 1996.

LEVERTON, L.Q.; KAPER, J.B. Temporal expression of Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes in an in vitro model of infection. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1034-1043, 2005.

LEVINE, M.M.; BERGQUIST, E.J.; NALIN, D.R.; WATERMAN, D.H.; HORNICK, R.B.; YOUNG, C.R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* that cause

diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 1, p. 1119-1122, 1978.

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

LEVINE, M.M.; NATARO, J.P.; KARCH, H.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; CLEMENTS, M.L.; O'BRIEN, A.D. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 550-559, 1985.

LEVINE M.M.; FERRECCIO, C.; PRADO, V.; CAYAZZO, M., ABREGO, P.; MARTINEZ, J.; MAGGI, L.; BALDINI, M.M.; MARTIN, W., MANEVAL, D. et al. Epidemiological studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level Peri-urban community in Santiago, Chile. **Am. J. Epidemiol.**, v. 138, p. 849-869, 1993.

LOMMEL, S.; BENESCH, S.; ROHDE, M.; WEHLAND, J.; ROTTNER, K. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. **Cell. Microbiol.**, v. 6, p. 243-254, 2004.

LUO, Y.; FREY, E.A.; PFUETZNER, R.A.; CREAGH, A.L.; KNOECHEL, D.G.; HAYNES, C.A.; FINLAY, B.B.; STRYNADKA, N.C. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v. 405, p. 1073–1077, 2000.

MAIRENA, E. C. **Caracterização molecular da região LEE 4 em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica e enterohemorrágica de diversos sorotipos.** Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

McDANIEL, T.K.; KAPER, J.B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Mol. Microbiol.**, v. 23, p. 399-407, 1997.

McNAMARA, B.P.; DONNENBERG, M.S. A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 107, p. 621–629, 2000.

McNAMARA, B.P.; DONNENBERG, M.S. Evidence for specificity in type 4 pilus biogenesis by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 146, p. 719-29, 2000.

McNAMARA, B.P.; KOUTSOURIS, A.; O'CONNELL, C.B.; NOUGAYREDE, J.P.; DONNENBERG, M.S.; HECHT, G. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. **J. Clin. Investig.**, v. 107, p. 621–629, 2001.

MELLIES, J.L.; ELLIOTT, S.J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. The *per* regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)- encoded regulator (Ler). **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 296-306, 1999.

MONTEIRO-DA-SILVA, M.L.; MORTARA, R.A.; BARROS, H.C.; de SOUZA W.; TRABULSI, L.R. Aggregation of membrane-associated actin filaments following localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells **J. Cell Science**, v. 93, p. 439-446, 1989.

MOON, H.W.; WHIPP S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M.; GIANELLA, 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.

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

MUZA-MOONS, M.M.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Disruption of cell polarity by Enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 7069-7078, 2003.

NARA, J.M., V. CIANCIARULLO, A.M., V. MENEZES, M.A., V. TRABULSI, L.R., V. PIAZZA, R.M.F. Expressão de *bundle-forming pilus* (BFP) de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC): caracterização fenotípica utilizando anticorpos policlonais. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos, São Paulo, 2005.

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

NETER, E.; WEBB, C.R.; SHUMWAY, C.N.; MURDOCK, M.R. Study on Etiology, Epidemiology, and Antibiotic Therapy of Infantile Diarrhea, with Particular Reference to Certain Serotypes of *Escherichia coli*. **American J. Public Health**, v. 41, p. 1490-1496, 1951.

NETER, E. Symposium on Enterobacteriaceae of medical significance: isolation, identification, and pathogenic potentialities. *In: Fifty-sixth General Meeting of the Society of American Bacteriologists*, Houston, Texas, 1955.

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

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

NICHOLLS, L.; GRANT, T.H.; ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 275-288, 2000.

NOUGAYREDE, J.P.; FERNANDES, P.J.; DONNENBERG, M.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 359-372. 2003.

NUNES, E.B.; SARIDAKIS, H.O.; IRINO, K.; PELAYO, J.S. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC)

isolated from children with and without diarrhea in Londrina. **Brazil. J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 499-504, 2003.

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

PARRY, D.A.; STEINERT, P.M. Intermediate filament structure. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 4, p. 94–98, 1992.

PALLEN, M.J.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Coiled-coil domains in proteins secreted by type III secretion systems. **Mol. Microbiol.**, v. 25, p. 423–425, 1997.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6999-7009, 2001.

PEDROSO, M.Z.; FREYMÜLLER, E.; TRABULSI L.R.; GOMES, T.A.T. Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 1152-1156, 1993.

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

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

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

PHILPOTT, D.J.; MCKAY, D.M.; SHERMAN, P.M.; PERDUE, M.H. Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. 634-645, 1996.

RAPPAPORT, F.; HENIG, E. Media for the isolation and differentiation of pathogenic *Escherichia coli* (serotypes O111 and O55). **J. Clin. Pathol.**, v. 5, p. 361-362, 1952.

REY, J.; SANCHEZ, S.; BLANCO, J.E.; MENDOZA, J.H.; MENDOZA, M.H.; GARCIA, A.; GIL, C.; TEJERO, N.; RUBIO, R; ALONSO, J.M. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 107, p. 212-217, 2005.

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

ROCHA, L.B., V. MAGALHÃES, C.A., V. NARA, J.M., V. MENEZES, M.A., V. TRABULSI, L.R., V. PIAZZA, R.M.F. Colony Immunoblotting como ferramenta na detecção de sorotipos de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). *In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Santos, São Paulo, 2005.

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I.C.A.; CAMPOS, L.C.; GOMES, T.A.T.; WHITTAM, T.S.; TRABULSI, L.R. Clonal Structure and Virulence Factors in Strains of *Escherichia coli* of the Classic Serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2680–2686, 1996.

ROTHBAUM, R.; McADAMS, A.J.; GIANNELLA, R.; PARTIN, J.C. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. **Gastroenterology**, v. 83, p. 441-54, 1982.

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

SÁNCHEZ-SANMARTÍN, C.; BUSTAMANTE, V.H.; CALVA, E.; PUENTE, J.L. Transcriptional regulation of the orf19 gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2823-33, 2001.

SCALETISKY, 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.

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

SCALETSKY, I.C.A.; MICHALSKI, J.; TORRES, A.G.; DULGUER, M.V.; KAPER, J.B. Identification and Characterization of the Locus for Diffuse Adherence, Which Encodes a Novel Afimbrial Adhesin Found in Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4753–4765, 2005.

SEARS, H.J.; BROWNLEE, I.; UCHIYAMA, J.K. Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man. **J. Bacteriol.**, v. 59, p. 293-301, 1949.

SHAW, R.K.; SMOLLETT, K.; CLEARY, J.; GARMENDIA, J.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4385–4390, 2005.

SINCLAIR, J.F.; O'BRIEN, A.D. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 2876–2885, 2002.

SINCLAIR, J.F.; DEAN-NYSTROM, E.A.; O'BRIEN, A.D. The established Intimin receptor Tir and the putative eukaryotic Intimin receptors Nucleolin and β 1-Integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes in vivo. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 1255-1265, 2006.

SINGH, M.P.; SHAW, R.K.; KNUTTON, S.; PALLEN, M.J.; CREPIN, V.F.; FRANKEL, G. Identification of amino acid residues within the N-terminal domain of EspA that play a role in EspA filament biogenesis and function. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 2221-6, 2008.

SMITH, J. The Association of Certain Types (A and B) of *Bact. coli* with Infantile Gastro-Enteritis. **J. Hyg.**, v. 47, p. 221-226, 1949.

SMITH, H.; SCOTLAND, S.; CHEATSY, T.; WILLSHAW, G.A.; ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 45-49, 1996.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J.L.; NGUYEN, W.; SHIN, S.; KAPER, J.B. Quorum-sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 96, p. 15196-15201, 1999.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J.L.; DELAHAY, R.M.; FRANKEL, G.; CRAWFORD, J.A.; NGUYEN, W.; KAPER, J.B. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) *LEE2* and *LEE3* operons by Ler. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 781–793, 2000.

STALEY, T.E.; JONES, E.; CORLEY, L.D. Attachment and Penetration of *Escherichia coli* Into Intestinal Epithelium of the Ileum in Newborn Pigs. **Amer. J. Pathol.**, v. 53, p. 371-392, 1969.

STALEY T.E.; CORLEY, L.D.; JONES, E. Early pathogenesis of colitis in neonatal pigs monocontaminated with *Escherichia coli*. Fine structural changes in the colonic epithelium. **Am. J. Dig. Dis.**, v. 15, p. 923-935, 1970.

STONE, K.D.; ZHANG, H.-Z.; CARLSON, L.K.; DONNENBERG, M.S. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for biogenesis of a type IV pilus. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 325–337, 1996.

SZALO, I.M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIÉRARD, D.; BALL, H.; MAINIL, J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. **Res. Microbiol.**, v.153, p. 653-658, 2002.

TARR, P.I.; BILGE, S.S.; VARY JR., V. J.C.; JELACIC, S.; HABEEB, R.L.; WARD, T.R.; BAYLOR, M.R.; BESSER, T.E. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1400–1407, 2000.

TARR, C.L.; WHITTAM, T.S. Molecular Evolution of the Intimin Gene in O111 Clones of Pathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 479–487, 2002.

TARR, C.L.; LARGE, T.M.; MOELLER, C.L.; LACHER, D.W.; TARR, P.I.; ACHESON, D.W.; WHITTAM, T.S. Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6853-6859, 2002.

TATSUNO, I.; HORIE, M.; ABE, H.; MIKI, T.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; TAGUCHI, H.; KAMIYA, S.; HAYASHI, T.; SASAKAWA, C. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6660–6669. 2001.

TATSUNO, I.; NAGANO, K.; TAGUCHI, K.; RONG, L.; MORI, H.; SASAKAWA, C. Increased adherence to Caco-2 cells caused by disruption of the *yhiE* and *yhiF* genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2598-2606, 2003.

TAYLOR, J.; POWELL, B.W.; WRIGHT, J. Infantile Diarrhoea and Vomiting. **Brit. Med. J.**, v. 2, p. 117-125, 1949.

TOBE, T.; SCHOOLNIK, G.K.; SOBEL, I.; BUSTAMANTE, V.H.; PUENTE, J.L. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 963-975, 1996.

TOLEDO, M.R.F.; ALVARIZA, M.C.B., v. MURAHOVSKI, J.; RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSII, L.R. Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes and Endemic Diarrhea in Infants. **Infect. Immun.**, v. 39, p. 586-589, 1983.

TORRES, M.E.; PIREZ, M.C.; SCHELOTTO, F.; VARELA, G.; PARODI, V.; ALLENDE, F.; FALCONI, E.; DELL'ACQUA, L.; GAIONE, P.; MENDEZ, M.V.; FERRARI, A.M.; MONTANO, A.; ZANETTA, E.; ACUNA, A.M.; CHIPARELLI, H.; INGOLD, E. Etiology of Children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and Unusual Isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2134–2139, 2001.

TORRES, A.G.; GIRON, J.A.; PERNA, N.T.; BURLAND, V.; BLATTNER, F.R.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, J.B. Identification and characterization of *lpfABCC DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5416–5427, 2002.

TOUZE, T.; HAYWARD, R.D.; ESWARAN, J.; LEONG, J.M.; KORONAKIS, V. Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain, p. a role in clustering of the Tir receptor. **Mol. Microbiol.**, v. 51, p. 73–87, 2004.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, p. procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4, 1979.

TOZZOLI, R.; CAPRIOLI, A.; MORABITO, S. Detection of *tox*B, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 4052-4056, 2005.

TRABULSI, L.R.; MANISSADJAN, A.; PENNA, H.A.; LIBERATORE, R.; DUAILIBE, L.; de CAMARGO, PEIXOTO E.S. Infantile diarrhea caused by enteropathogenic colibacilli. Preliminary studies on the occurrence of certain groups and serological types in São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 3, p. 267-270, 1961.

TRABULSI, L.R., V. KELLER, R., V. GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Emerging Infect. Dis.**, v. 5, p. 508-513, 2002.

TU, X.; NISAN, I.; YONA, C.; HANSKI, E.; ROSENSHINE, I. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 47, p. 595-606, 2003.

TZIPORI, S.; GUNZER, F.; DONNENBERG, M.S.; DE MONTIGNY L.; KAPER, J.B.; DONOHUE-ROLFE, A. The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3621-3627, 1995.

VIEIRA, M.A.; ANDRADE, J.R.; TRABULSI, L.R.; ROSA, A.C.; DIAS, A.M.; RAMOS, S.R.; FRANKEL, G.; GOMES, T.A. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 762-72, 2001.

WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; WACHSMUTH, I.K.; RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 512-520, 1983.

WHALE, A.D.; HERNANDES, R.T.; OOKA, T.; BEUTIN, L.; SCHÜLLER, S.; GARMENDIA, J.; CROWTHER, L.; VIEIRA, M.A.; OGURA, Y.; KRAUSE, G.; PHILLIPS, A.D.; GOMES, T.A.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology.**, v. 153, p. 1743-55, 2007.

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

WILSON, R.K.; SHAW, R.K.; DANIELL, S.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 753–762, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Program for control of diarrhoeal diseases. In: Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. Geneva, World Health Organization, p. 113, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Improving diarrhoea estimates. Child and Adolescent Health and Development, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; SATO, H.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 294-297, 2002.

YIP, C.K.; KIMBROUGH, T.G.; FELISE, H.B.; VUCKOVIC, M.; THOMAS, N.A.; PFUETZNER, R.A.; FREY, E.A.; FINLAY, B.B.; MILLER, S.I.; STRYNADKA, N.C.J. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. **Nature**, v. 435, p. 702–707, 2005.

ZHANG, W.L.; KÖHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SUERBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 4486-92, 2002.

ZHU, C.; AGIN, T.S.; ELLIOTT, S.J.; JOHNSON, L.A.; THATE, T.E.; KAPER, J.B.; BOEDEKER, E.C. Complete Nucleotide Sequence and Analysis of the Locus of Enterocyte Effacement from Rabbit Diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 2107–2115, 2001.

ZINGRA, M.I.R. Variações genicas e antigenicas de Tir em amostras de EPEC e EHEC: interação com diferentes subtipos de Intimina. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.