FRANCIELLI MAHNIC DE VASCONCELLOS

**PADRÃO DE ADESÃO AGREGATIVA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA TÍPICA E ATÍPICA: PAPEL DA
PROTEÍNA Shf**

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

**São Paulo
2009**

FRANCIELLI MAHNIC DE VASCONCELLOS

PADRÃO DE ADESÃO AGREGATIVA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM

***Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA TÍPICA E ATÍPICA:**

PAPEL DA PROTEÍNA Shf

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Júnior

**São Paulo
2009**

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

© reprodução total

Vasconcellos, Francielli Mahnic de.

Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em
Escherichia coli enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína
Shf / Francielli Mahnic de Vasconcellos. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Waldir Pereira Elias Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de
concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Mecanismos
moleculares da patogênese de *Escherichia coli* diarreioagênicas.

Versão do título para o inglês: Aggregative adherence pattern and
biofilm formation in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia*
coli: role of the Shf protein.

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. Virulência 3. Diarréia
4. Biofilmes I. Elias Junior, Waldir Pereira II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação
em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB080/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Francielli Mahnic de Vasconcellos.

Título da Dissertação: Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em
Escherichia coli enteroagregativa típica e atípica: papel da
proteína Shf.

Orientador(a): Waldir Pereira Elias Junior.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 147 nas fls. 40 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Waldir Pereira Elias Junior, Coordenador(a) da Linha de pesquisa — ***"Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em escherichia coli enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf"*** do qual participou(aram) o(s) alunos **Francielli Mahnic de Vasconcellos**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **27.02.2007**.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2007.

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice-Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA – ICB/USP

Aos meus pais, Carlos e Vera por sempre apoiarem as minhas decisões, e me incentivarem durante toda a minha vida. Às minhas irmãs, Michelli e Jacqueline pelo carinho, amizade e palavras amigas.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP), com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 06/58302-9).

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Júnior, meu orientador durante este projeto, pelo incentivo e confiança, por todo o conhecimento transmitido e pela amizade durante esses anos.

À Dra. Roxane Fontes Piazza, por ter me recebido no laboratório de Bacteriologia, pela confiança, ajuda e sugestões no decorrer do projeto.

À Dra. Marcia Regina Franzolin, pela ajuda, disponibilidade e amizade.

À Dra. Patrícia A. de Abreu de Aniz pela preciosa ajuda e discussões para o melhor desenvolvimento do projeto.

Às Dras. Kinue Irino e Carla Taddei pela colaboração na sorotipagem das amostras utilizadas neste estudo.

Ao doutorando, Márcio A. Menezes, pela ajuda nos experimentos, por estar sempre disposto a ajudar, e pela amizade, almoços, cafés e baladas juntos.

Ao estagiário Luciano Bevilacqua pelas incontáveis ajudas no decorrer do projeto, pela disposição em ajudar e pela companhia durante esse tempo no laboratório.

Aos amigos de bancada Sergio, Vanessa, Bianca, Renato e Karina, pela ajuda, companheirismo e risadas.

À amiga Sarita S. Rossato, pela amizade, baladas, passeios, por sempre estar por perto e escutar as minhas reclamações, e por me ter que me agüentar todos os dias.

A todos os demais colegas do laboratório não citados, porém sempre lembrados, por todos esses anos de convivência, amizade e descontração.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Bacteriologia, sempre prestativos.

À minha família por sempre me apoiarem e dividirem comigo todas as alegrias e tristezas mesmo que à distância, afinal são a razão por todo o esforço e dedicação para a finalização de mais uma etapa.

Obrigada!!!

RESUMO

VASCONCELLOS, F. M. **Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica**: papel da proteína Shf. 96 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é considerada um enteropatógeno emergente, caracterizado pela expressão do padrão de adesão agregativa (AA) em células epiteliais cultivadas. Vários potenciais fatores de virulência de EAEC são codificados por genes localizados no plasmídeo de virulência pAA2 da amostra protótipo 042, incluindo o gene *aggR*, que codifica uma proteína reguladora de vários fatores de virulência de EAEC. A classificação de EAEC em típica e atípica se baseia na presença ou ausência do gene *aggR*, respectivamente. Um gene de 842 pb denominado *shf*, a qual codifica uma proteína predita de 32,8 kDa, também foi localizado no plasmídeo pAA2. Essa proteína apresenta 25% de similaridade com a proteína IcaB de *Staphylococcus epidermidis*, que possui relação na formação de biofilme dessa espécie. Os objetivos deste estudo foram verificar a prevalência do gene *shf* em amostras de EAEC isoladas no Brasil e caracterizar o envolvimento da proteína Shf na capacidade de formação de biofilme e no estabelecimento do padrão AA em EAEC típica e atípica. Cento e treze amostras de EAEC isoladas de crianças com diarreia na cidade de Salvador (BA) foram investigadas quanto à presença de *shf* e *aggR*. O gene *shf* foi detectado em 41 (36,3%) amostras de EAEC. Através da detecção do gene *aggR*, essas amostras foram classificadas como típicas e atípicas. Desta forma, o gene *shf* foi detectado em 25 (37,3%) EAEC típicas e em 16 (34,8%) EAEC atípicas. As 41 amostras em que *shf* foi detectado foram analisadas quanto ao sorogrupo, adesão em células HEp-2 e capacidade de formar biofilme em poliestireno. Nenhuma dessas características foi associada com a presença de *shf* nos grupos de EAEC típica ou atípica e a formação de biofilme foi detectada em todas as amostras. Para avaliar o eventual envolvimento da proteína Shf nos fenótipos de AA e de formação de biofilme, foram realizadas mutagêneses não-polares no gene *shf* das amostras protótipo de EAEC típica (042) e atípica (2871-1). Os mutantes obtidos (042::pFV3 e 2871-1::pFV3) foram avaliados nos ensaios de adesão em células HEp-2 e de formação de biofilme em placas de poliestireno. Foi observado em ambos os mutantes uma drástica diminuição na capacidade de formação de biofilme e a incapacidade de aderir em células HEp-2. Este estudo demonstrou que, embora o papel de Shf na patogênese de EAEC não esteja esclarecido, o gene *shf* foi detectado em alta prevalência em amostras de EAEC isoladas no Brasil e Shf participa do estabelecimento do padrão AA, bem como da capacidade de formação de biofilme em EAEC típica e atípica. Além disso, *shf* não deve ser regulado exclusivamente por AggR, uma vez que o nocaute nesse gene na amostra de EAEC atípica (desprovida de *aggR*) aboliu os fenótipos avaliados, indicando que *shf* é expresso em EAEC atípica.

Palavras-chave: Diarreia; *Escherichia coli* enteroagregativa; Adesão; Biofilme.

ABSTRACT

VASCONCELLOS, F. M. **Aggregative adherence pattern and biofilm formation in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*: role of the Shf protein.** 96 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is considered an emergent enteropathogen, characterized by the expression of the aggregative adherence (AA) pattern on cultured epithelial cells. Several EAEC putative virulence factors are encoded by genes located in the pAA2 virulence plasmid present in the prototype strain 042, including *aggR* that encodes a regulator of several EAEC virulence factors. The classification of EAEC in typical and atypical is based on the presence or absence of *aggR*, respectively. A 842-pb gene named *shf*, which encodes a predicted protein of 32.8 kDa, has also been identified in the pAA2 plasmid. This protein presents 25% of similarity with the IcaB protein of *Staphylococcus epidermidis*, which has been associated with biofilm formation in this specie. The objectives of this study were to verify the prevalence of *shf* among EAEC strains isolated in Brazil, and to characterize the role of the Shf protein in the establishment of the AA pattern and biofilm formation of typical and atypical EAEC. One hundred and thirteen EAEC strains isolated from children with diarrhea in the city of Salvador (BA) were investigated regarding the presence of *shf* and *aggR*. The *shf* gene was detected in 41 (36,3%) EAEC strains. By the presence of *aggR*, these strains were classified as typical and atypical. Therefore, the *shf* gene was detected in 25 (37,3%) typical EAEC and in 16 (34,8%) atypical EAEC. The 41 strains that harbored *shf* were analyzed regarding their serogroups, adherence patterns to HEp-2 cells and the ability to form biofilm in polystyrene. None of these characteristics was associated with the presence of *shf* in the typical and atypical EAEC groups, and the capacity to form biofilm was detected in all strains. In order to evaluate the role of Shf in the AA and biofilm phenotypes, non-polar mutagenesis of *shf* were performed in the typical (042) and atypical (2871-1) EAEC prototype strains. The mutants obtained (042::pFV3 e 2871-1::pFV3) were evaluated in the adherence test with HEp-2 cells and in the biofilm assay in polystyrene plates, demonstrating in both mutants a drastic reduction in the biofilm formation and the inability to adhere to HEp-2 cells. This study demonstrated that, although the role of Shf in the pathogenesis of EAEC is unclear, the *shf* gene was detected in high prevalence among EAEC strains isolated in Brazil and that Shf was involved in the establishment of the AA pattern as well as in the biofilm formation of typical and atypical EAEC. Moreover, *shf* may not be exclusively regulated by AggR, since the knockout in this gene present in the atypical EAEC strain (devoid of *aggR*) abolished the evaluated phenotypes, indicating that *shf* is expressed in atypical EAEC.

Key words: Diarrhea; Enteroaggregative *Escherichia coli*; Adherence; Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Capacidade de formação de biofilme em poliestireno apresentada pelas amostras de EAEC típicas e atípicas que albergam o gene <i>shf</i>	50
Figura 2 - Padrões de interação das amostras de EAEC 042 (típica) e 2871-1 (atípica) com células HEP-2.	51
Figura 3 - Pesquisa da presença do gene <i>shf</i> nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1).	52
Figura 4 - Pesquisa da presença do gene <i>agg3A</i> nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1).	53
Figura 5 - Pesquisa da presença do gene <i>agg3C</i> nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1).	54
Figura 6 - Pesquisa da presença do gene <i>aaiA</i> nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1).	55
Figura 7 - Pesquisa da presença do gene <i>pilS</i> nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1).	56
Figura 8 - Pesquisa da presença do gene <i>virK</i> nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1).	57
Figura 9 - Pesquisa da presença do gene <i>capU</i> nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1).	58
Figura 10 - Curva de crescimento da amostra 2871-1 selvagem e mutante resistente ao ácido nalidíxico (2871-1/Nal).	60
Figura 11 - Purificação do fragmento <i>shf</i> amplificado por PCR. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto amplificado na reação de PCR para o gene <i>shf</i> , utilizando os iniciadores <i>shf</i> (F e R) e o DNA da amostra 042.	61
Figura 12 - Análise do perfil de restrição do plasmídeo pFV2. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA plasmidial extraído da amostra JM109(pFV2) antes e após a digestão com a enzima <i>EcoRI</i>	62
Figura 13 - Purificação do fragmento <i>shf</i> clonado no plasmídeo pFV2. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do produto de 613 pb da digestão do plasmídeo pFV2 com a enzima <i>EcoRI</i>	63
Figura 14 - Confirmação da presença do fragmento <i>shf</i> no plasmídeo pFV3 através de PCR.	64

Figura 15 - Padrão de interação das amostras de EAEC 042 (típica), 2871-1 (atípica) e de seus respectivos mutantes 042::pFV3 e 2871-1/Nal::pFV3 com células epiteliais HEP-2.66

Figura 16 - Capacidade de formação de biofilme em poliestireno apresentada pelas amostras de EAEC típica (042), atípica (2871-1) e de seus respectivos mutantes 042::pFV3 e 2871-1/Nal::pFV3.67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos plasmídeos empregados neste estudo.	35
Tabela 2 - Seqüência dos iniciadores, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR deste estudo.	37
Tabela 3 - Análise das amostras de EAEC <i>shf</i> ⁺ quanto aos sorogrupos, padrões de adesão, capacidade de formação de biofilme e presença do gene <i>aggR</i>	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 <i>Escherichia coli</i>.....	15
1.2 <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas	15
1.3 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	17
1.3.1 Histórico	17
1.3.2 Epidemiologia	18
1.3.3 Sorotipos	20
1.3.4 Diagnóstico	21
1.3.5 Patogenicidade	22
1.3.6 Potenciais fatores de virulência	23
2 OBJETIVO	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Meios de cultura e soluções	34
3.2 Amostras bacterianas	34
3.3 Sorogrupagem das amostras de EAEC	35
3.4 Pesquisa dos genes de virulência de EAEC.....	36
3.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	36
3.4.2 Eletroforese em gel de agarose	37
3.5 Ensaio de adesão em células HEP-2	38
3.5.1 Cultivo das células e preparo das microplacas	38
3.5.2 Ensaio da adesão.....	38
3.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilme in vitro.....	39
3.7 Mutação do gene <i>shf</i> nas amostras 042 e 2871-1	40
3.7.1 Obtenção da amostra 2871-1 resistente ao ácido nalidíxico	40

3.7.2 Clonagem do gene shf no vetor de clonagem pGEM-T Easy	41
3.7.2.1 Obtenção do inserto shf	41
3.7.2.2 Ligação do inserto ao vetor pGEM-T Easy	42
3.7.2.3 Transformação através de eletroporação	42
3.7.2.4 Seleção do clone contendo o inserto shf no vetor pGEM-T Easy	43
3.7.3 Subclonagem do inserto shf no vetor pJP5603	44
3.7.3.1 Ligação do inserto ao vetor pJP5603	44
3.7.3.2 Transformação por eletroporação	44
3.7.3.3 Seleção do clone contendo o inserto shf no vetor pJP5603	45
3.7.4 Conjugação da amostra DH5αpir(pFV3) com as amostras de EAEC típica e atípica	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Prevalência do gene shf em amostras de EAEC isoladas de crianças com diarreia	47
4.2 Caracterização fenotípica das amostras de EAEC positivas para o gene shf	47
4.3 Caracterização fenotípica das amostras de EAEC típica e atípica selecionadas como protótipos	50
4.4 Caracterização genotípica das amostras de EAEC típica e atípica selecionadas como protótipos	52
4.5 Determinação do papel da proteína Shf na adesão agregativa e na capacidade de formação de biofilme de EAEC típica e atípica	59
4.5.1 Mutagênese de shf nas amostras 042 e 2871-1	59
4.5.2 Análise fenotípica dos mutantes shf –	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais versáteis encontrados na natureza. De ampla distribuição, normalmente coloniza o trato gastrointestinal de humanos e animais, onde faz parte da microbiota e estabelece uma relação mutuamente benéfica com seu hospedeiro. É um dos primeiros gêneros bacterianos a colonizar o trato gastrointestinal humano, já identificada nos primeiros meses de vida, sendo um dos constituintes principais da microbiota intestinal até o fim da vida (GUARNER; MELAGELADA, 2003; NOVERR; HUFFNAGLE, 2004). Foi isolada e identificada primeiramente em 1885 pelo pediatra alemão Theodore Escherich sob o nome de *Bacillus coli commune*. Em 1919 foi renomeada *Escherichia coli* em homenagem ao pesquisador que a descreveu (CHEN; FRANKEL, 2005). É uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família Enterobacteriaceae (BOPP *et al.*, 1999).

Contudo, durante a evolução alguns clones de *E. coli* adquiriram fatores de virulência que lhes conferiram adaptação a novos nichos e a capacidade de causar um amplo espectro de doenças. As cepas patogênicas de *E. coli* podem causar infecções intestinais ou extra-intestinais (NATARO; KAPER, 1998). As amostras de *E. coli* associadas às infecções extra-intestinais são conhecidas por ExPEC (RUSSO; JOHNSON, 2000), enquanto as amostras associadas às infecções intestinais, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (ECD) e são classificadas em seis patótipos (NATARO; KAPER, 1998).

1.2 *E. coli* diarreiogênicas

Inicialmente todas as linhagens diarreiogênicas de *E. coli* eram denominadas enteropatogênicas, mas ao passo em que foram sendo descobertos os seus mecanismos de patogênese específicos elas foram sendo agrupadas em patótipos (KAPER *et al.*, 2004).

As amostras de ECD são classificadas em seis patótipos ou categorias, 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 *in vitro* (NATARO; KAPER, 1998). Esses patótipos 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) (NATARO; KAPER, 1998). Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, estudos evidenciam que alguns patótipos incluem microrganismos bastante diferentes. Desta forma, as EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas, e as EHEC passaram a constituir uma subcategoria de STEC, ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (HARRINGTON *et al.*, 2006; KAPER *et al.*, 2004).

As amostras de EPEC estão associadas à diarreia aguda em crianças principalmente no primeiro ano de vida. Esse patótipo tem a capacidade de causar uma lesão histopatológica no epitélio intestinal, bem como em cultura celular, denominada lesão *attaching and effacing* (A/E), além de não secretarem a toxina de Shiga (Stx) (TRABULSI *et al.*, 2002). A lesão A/E é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais, aderência íntima da bactéria à membrana apical da célula epitelial, rearranjo do citoesqueleto e formação de estruturas celulares semelhantes a pedestais, formados pelo acúmulo de actina polimerizada, onde a bactéria permanece aderida (MOON *et al.*, 1983).

ETEC é o patótipo de ECD capaz de produzir uma ou ambas enterotoxinas, denominadas termolábil (LT) e termoestável (ST). Esse patótipo pode aderir à mucosa intestinal através dos seus vários fatores de colonização (LEVINE, 1987). A colonização e a presença das enterotoxinas levam a uma diarreia aquosa tipicamente associada à infecção causada por ETEC, atingindo crianças e adultos. Além disso é fortemente associada como agente de diarreia do viajante (NATARO; KAPER, 1998).

As amostras de EIEC causam diarreia aquosa, colite inflamatória e disenteria em humanos. São bioquímica, genética e patogenicamente relacionadas à *Shigella* spp.. O mecanismo de patogênese das EIEC consiste

da invasão da mucosa intestinal, seguido de fagocitose e lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimentação no citoplasma e passagem para as células adjacentes (PARSOT, 2005).

STEC foi primeiramente identificada nos Estados Unidos em 1982, como agente de um surto de diarreia sanguinolenta e da síndrome hemolítica urêmica (SHU) (RILEY *et al.*, 1983). STEC é classificada como um patógeno zoonótico emergente que pode causar gastroenterite e colite hemorrágica, podendo ainda produzir uma severa complicação renal, a SHU, devido à translocação da toxina Stx através do intestino (FRANKEL *et al.*, 1998). As STEC possuem ainda uma subcategoria, denominada EHEC, sendo que a diferença entre essas subcategorias se dá pela capacidade das EHEC de produzir a lesão A/E, semelhante às EPEC (NATARO; KAPER, 1998).

DAEC foi assim denominada devido ao padrão de adesão difusa (AD) que as amostras deste patótipo apresentam em ensaios de adesão em células epiteliais cultivadas, onde as bactérias aderem-se de forma difusa sobre toda a superfície celular (NATARO *et al.*, 1987). A associação de DAEC com diarreia é controversa, uma vez que vários estudos epidemiológicos não associam esse patótipo à doença diarreica (GOMES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2002; SCALETSKY *et al.*, 2002a; GIRÓN *et al.*, 1991).

EAEC é definida como o patótipo de *E. coli* que adere a células epiteliais cultivadas no padrão denominado agregativo (NATARO *et al.*, 1987). Desde a sua descrição em 1987, EAEC tem sido reconhecida cada vez mais como agente de diarreia aguda e persistente em países em desenvolvimento e desenvolvidos e é, atualmente, considerado um enteropatógeno emergente (KAPER *et al.*, 2004; HARRINGTON *et al.*, 2006).

1.3 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

1.3.1 Histórico

Cravioto *et al.* (1979) reportaram que a maioria das EPEC apresentavam a capacidade de aderir às células epiteliais cultivadas da linhagem HEp-2, e que o fenótipo aderente poderia ser utilizado para diferenciação de EPEC. Subseqüentemente, outros estudos demonstraram

que muitas *E. coli* não classificadas como EPEC, também aderiam à camada semi-confluente de cultura de células, porém, em um padrão distinto do apresentado pela categoria de EPEC. Enquanto a adesão de EPEC era do tipo localizada, ou seja, as bactérias se apresentavam aderidas em pontos específicos da superfície da célula epitelial, em grupamentos compactos de bactérias, as amostras não classificadas como EPEC apresentavam um padrão difuso de aderência sobre a superfície celular (SCALETSKY *et al.*, 1984; NATARO *et al.*, 1985). Posteriormente esse padrão inicialmente chamado de difuso foi reclassificado em “padrão difuso propriamente dito” e “padrão agregativo” (NATARO *et al.*, 1987).

O termo adesão agregativa (AA) foi estabelecido por Nataro *et al.* (1987), para definir o padrão de adesão em células HEP-2 apresentado por amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico envolvendo crianças com diarreia no Chile. No padrão AA as bactérias aderem-se umas as outras, à superfície das células HEP-2, e também à superfície da lamínula na ausência de células, numa configuração que lembra tijolos empilhados, formando agregados heterogêneos (NATARO *et al.*, 1987).

De modo semelhante ao que ocorreu com as EPEC, Sarantuya *et al.* (2004) propuseram a classificação de amostras de EAEC nos grupos típica e atípica. Enquanto as EPEC são classificadas nesses dois grupos levando-se em conta a presença ou ausência do plasmídeo *EPEC adherence factor* (pEAF) (KAPER, 1996), no patótipo EAEC essa classificação se baseia na presença ou não do gene *aggR*, o qual codifica uma proteína reguladora global dos genes de virulência de EAEC e está localizado no plasmídeo de virulência de EAEC (NATARO *et al.*, 1994; HARRINGTON *et al.*, 2006).

1.3.2 Epidemiologia

EAEC foi inicialmente descrita em associação com diarreia aguda em crianças (NATARO *et al.*, 1987). Em seguida, inúmeros estudos epidemiológicos foram realizados em países em desenvolvimento avaliando EAEC como agente associado à diarreia aguda. Vários desses estudos encontraram essa associação (BOUZARI *et al.*, 1994; GONZÁLEZ *et al.*, 1997; NATARO *et al.*, 1987; PAUL *et al.*, 1994), mas em alguns tal associação não foi

encontrada (BHATNAGAR *et al.*, 1993; CRAVIOTO *et al.*, 1991; GOMES *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1998).

Essa controvérsia pode estar associada às diferenças entre esses estudos no que se refere à faixa etária dos grupos estudados e aos métodos de detecção de EAEC. Nos últimos anos a associação entre EAEC e diarreia aguda na infância tem sido sempre positiva, tanto em países em desenvolvimento (BUERIS *et al.*, 2007; REGUA-MANGIA *et al.*, 2004; NGUYEN *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2002; SCALETISKY *et al.*, 2002b; OKEKE *et al.*, 2000), como desenvolvidos (COHEN *et al.*, 2005; NATARO *et al.*, 2006; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004). Nos EUA, EAEC é um dos patógenos mais comumente identificados em casos de diarreia (FLORES; OKHUUSEN, 2009).

Outros estudos epidemiológicos realizados também em países em desenvolvimento associaram fortemente EAEC à diarreia persistente, ou seja, com duração maior que 14 dias (BHAN *et al.*, 1989; CRAVIOTO *et al.*, 1991; FANG *et al.*, 1995). No Brasil estudos demonstraram a associação entre EAEC e a diarreia persistente na cidade de Fortaleza, onde EAEC está implicada em mais de 68% dos casos (PINTO *et al.*, 1983; LIMA *et al.*, 1992; FANG *et al.*, 1995). Nessa mesma cidade, Steiner *et al.* (1998) demonstraram a relação entre colonização por EAEC, independente da sintomatologia de diarreia, e o déficit de desenvolvimento (peso/altura) de crianças de baixo nível sócio-econômico.

Vários estudos sobre a etiologia da diarreia do viajante, que afeta indivíduos residentes de países desenvolvidos que visitam países em desenvolvimento, apontam uma alta prevalência de EAEC (ADACHI *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2002; MOHAMED *et al.*, 2007).

Há também relatos na literatura da associação de EAEC como agente de diarreia aguda e persistente em pacientes imunocomprometidos, como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (DURRER *et al.*, 2000; GERMANI *et al.*, 1998; KELLY *et al.*, 2003; PABST *et al.*, 2003; SAMIE *et al.*, 2008).

Surtos de diarreia causados por EAEC, associados à ingestão de alimentos ou água contaminados, foram relatados em países desenvolvidos

(HARADA *et al.*, 2007; ITOH *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1997).

Esses diversos estudos demonstrando a associação epidemiológica entre EAEC e diarreia aguda, persistente e diarreia do viajante, além do relato de surtos de diarreia causados por EAEC, apontam que este patótipo deve ser considerado emergente (NATARO; KAPER, 1998), inclusive no Brasil onde em estudos recentes sobre a etiologia da diarreia aguda tem sido encontrado como o agente bacteriano mais freqüente (BUERIS *et al.*, 2007; REGUAMANGIA *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2002; SCALETSKY *et al.*, 2002b).

1.3.3 Sorotipos

A *E. coli* apresenta antígenos de superfície que possibilitam a sua classificação em sorogrupos (tipagem do antígeno somático ou O) e sorotipos (tipagem dos antígenos somático e flagelar ou H) (EWING, 1986). A sorotipagem de amostras de *E. coli* é extremamente útil em estudos epidemiológicos e no diagnóstico de EPEC típica e EIEC. Quando aplicada em EAEC a sorotipagem evidencia uma grande diversidade de sorotipos (CZECZULIN *et al.*, 1999; JENKINS *et al.*, 2006a; KNUTTON *et al.*, 1992; PIVA *et al.*, 2003; UBER *et al.*, 2006; VIAL *et al.*, 1988; ZAMBONI *et al.*, 2004), sem a prevalência de nenhum.

Nataro e Kaper (1998) relataram os seguintes sorotipos de EAEC como os mais freqüentes em uma compilação de vários relatos: O3:H2, O15:H18, O44:H18, O86:NM, O77:H18, O111:H12, O111:H21 e O127:H2.

A existência de um grande número de amostras não tipáveis quanto ao antígeno O ou rugosas tem sido relatada nesta categoria (KESKIMÄKI *et al.*, 2001; VIAL *et al.*, 1988; UBER *et al.*, 2006). Um grande número de cepas de EAEC são imóveis ou não tipáveis quanto ao antígeno H (KESKIMÄKI *et al.*, 2001; KNUTTON *et al.*, 1992; VIAL *et al.*, 1988; UBER *et al.*, 2006), dificultando a análise da relação entre sorotipo e outras características da amostra. Desta forma, a sorotipagem não representa uma ferramenta útil para o diagnóstico de EAEC.

1.3.4 Diagnóstico

O padrão AA demonstrado no teste de adesão em células HeLa ou HEp-2 é usado como diagnóstico padrão (*gold standard*) para a classificação de EAEC (NATARO; KAPER; 1998), uma vez que ainda não foi encontrado um determinante genético comum para todas as amostras deste patótipo (HARRINGTON *et al.*, 2006).

Já foram encontradas variações do padrão AA originalmente descrito, as quais incluem a adesão das bactérias no padrão AA preferencialmente à lamínula (AAs) ou preferencialmente à superfície celular (AA_{cel}) (KNUTTON *et al.*, 1992; PAUL, *et al.*, 1994; GIOPOPO, *et al.*, 2000; SUZART *et al.*, 2001).

O fenótipo de agregação bacteriana também pode ser evidenciado pela formação de uma película na superfície da cultura, quando amostras de EAEC são cultivadas em caldo Müller-Hinton (ALBERT *et al.*, 1993), bem como pela capacidade dessas bactérias em formar biofilmes sobre superfícies de poliestireno ou vidro, importante característica associada à virulência de EAEC (MOHAMED *et al.*, 2007; SHEIKH *et al.*, 2001; WAKIMOTO *et al.*, 2004). Foi proposto por Wakimoto *et al.* (2004) um teste quantitativo de formação de biofilme utilizando placas de poliestireno para o diagnóstico de EAEC.

Baudry *et al.* (1990) desenvolveram uma sonda genética sensível e específica para o diagnóstico de EAEC, inicialmente denominada CVD432, a qual consistia em um fragmento críptico de 1 kb do plasmídeo de virulência presente na amostra de EAEC 17-2 (sorotipo O3:H2). Desta forma, a sonda CVD432 detecta a presença do plasmídeo associado à virulência em EAEC. Posteriormente, essa sonda passou a ser também denominada sonda AA ou sonda EAEC, e foi amplamente empregada em diversos estudos epidemiológicos, demonstrando que a sua especificidade e sensibilidade variam de acordo com o grupo de amostras estudadas (FANG *et al.*, 1995; FARUQUE *et al.*, 1992; GIOPOPO *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 1998; OKEKE *et al.*, 2000; PAUL *et al.*, 1994).

Em 1995, Schmidt *et al.*, seqüenciaram o fragmento sonda CVD432 e a partir dessa seqüência desenharam um par de iniciadores para a detecção de EAEC através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR).

Recentemente, Nishi *et al.* (2003) evidenciaram que o fragmento sonda CVD432 na verdade corresponde ao gene *aatA*, o qual faz parte de um cluster de cinco genes (*aatPABCD*) que codificam as proteínas do sistema do tipo ABC de secreção. Desta forma, a sonda CVD432 passou a ser corretamente denominada de *aatA*.

Alguns autores propuseram o diagnóstico para EAEC baseado na técnica de PCR *multiplex*, empregando a detecção simultânea de marcadores plasmidiais (BOUZARI *et al.*, 2005; CERNA *et al.*, 2003; RÜTTLER *et al.*, 2006) ou plasmidiais e cromossômicos (JENKINS *et al.*, 2006b) específicos para EAEC. Essa técnica foi avaliada como específica e sensível para a caracterização de amostras de EAEC isoladas de fezes (CORDEIRO *et al.*, 2008).

Um estudo recente demonstrou que o DNA de EAEC pode ser recuperado para realização da técnica de PCR no diagnóstico de EAEC, a partir de cartões de papel de filtro empregados na coleta de fezes para a detecção de sangue oculto (GRIMES *et al.*, 2008).

Conforme mencionado anteriormente, a sorotipagem não representa uma ferramenta útil no diagnóstico de EAEC. Desta maneira, apesar das tentativas de se criarem novas técnicas fenotípicas e moleculares sensíveis e específicas para o diagnóstico de EAEC, o ensaio de detecção do padrão de adesão agregativa em células HEp-2 ou HeLa continua sendo o teste padrão para a identificação desse patótipo.

1.3.5 Patogenicidade

Vários potenciais fatores de virulência foram descritos em EAEC, mas a patogênese da diarreia causada por esse patótipo ainda não foi esclarecida (HARRINGTON *et al.*, 2006). EAEC intensifica a secreção de muco na mucosa intestinal formando um denso biofilme no local. O papel da produção de muco na patogênese de EAEC não está claro, mas a formação de biofilme pode estar envolvida com o caráter persistente da colonização e da diarreia (NATARO; KAPER, 1998).

Acredita-se que a diarreia causada por EAEC se inicia com a adesão agregativa nos tecidos do íleo e cólon por um número variado de adesinas,

seguida pela secreção de uma ou mais enterotoxinas (HARRINGTON *et al.*, 2006).

Nataro *et al.* (1998) propuseram um modelo de três estágios para a patogênese de EAEC. O primeiro estágio envolve a adesão inicial à mucosa intestinal e à monocamada de muco, sendo que essa adesão é mediada pelas fímbrias AAF. O segundo estágio compreende a indução de uma maior produção de muco, levando à formação de biofilme nessa camada mucóide. Essa camada de biofilme e muco pode levar a colonização persistente e má absorção de nutrientes. E finalmente, o terceiro estágio, sugerido após observações histopatológicas e evidências moleculares, que incluem a produção de toxinas e o desencadeamento de um processo inflamatório, o qual resulta em danos à mucosa e secreção intestinal. O hospedeiro que sofre de subnutrição pode ser incapaz de reparar os danos e tende a desenvolver a síndrome da diarreia persistente.

As manifestações clínicas resultantes da infecção por EAEC são a diarreia aguda e persistente (HARRINGTON *et al.*, 2006). A diarreia pode ser aquosa ou mucóide, com poucos relatos de febre ou vômito (BHAN *et al.*, 1994; PAUL *et al.*, 1994).

A patogenicidade de EAEC tem sido atribuída a fatores particulares que não estão uniformemente distribuídos entre as amostras de EAEC isoladas ao redor do mundo (NATARO, KAPER, 1998; SPENCER *et al.*, 1999; OKEKE *et al.*, 2000; SARANTUYA *et al.*, 2004; JENKINS *et al.*, 2006a; UBER *et al.*, 2006).

1.3.6 Potenciais fatores de virulência

Além da expressão de adesinas e toxinas, vários outros fatores de virulência têm sido descritos em EAEC, codificados por genes localizados tanto em plasmídeos quanto no cromossomo de amostras consideradas protótipo (WEINTRAUB, 2007).

Grande parte dos potenciais fatores de virulência descritos em EAEC foi caracterizada na amostra protótipo de EAEC 042. Essa amostra pertencente ao sorotipo O44:H18, foi isolada de um caso de diarreia no Peru e foi capaz de causar diarreia em voluntários humanos (NATARO *et al.*, 1985).

Nessa amostra, a maioria dos genes que codificam esses fatores estão localizados no plasmídeo de virulência pAA2 (~100 kb) presente nesta amostra (CZECZULIN *et al.*, 1999).

Embora uma diversidade de adesinas, toxinas e proteínas envolvidas em algum processo de virulência tenham sido descritas em EAEC, tem sido amplamente demonstrado que a prevalência dos genes que codificam esses marcadores é bastante variável com relação à origem geográfica das amostras e nenhum deles foi encontrado em todas as amostras de EAEC (BOUZARI *et al.*, 2005; CZECZULIN *et al.*, 1999; ELIAS *et al.*, 2002; GIOPPPO *et al.*, 2000; JENKINS *et al.*, 2006a; MOHAMED *et al.*, 2007; OKEKE *et al.*, 2000; PIVA *et al.*, 2003; SUZART *et al.*, 2001; ZAMBONI *et al.*, 2004).

Diversas adesinas fimbriais e afimbriais já foram descritas como responsáveis pelo estabelecimento do padrão AA em amostras de EAEC. Entretanto, a prevalência dos genes que codificam essas adesinas é geralmente baixa, demonstrando a diversidade de estruturas de superfície associadas à adesão agregativa (BERNIER *et al.*, 2002; BOISEN *et al.*, 2008; CZECZULIN *et al.*, 1997; DEBROY *et al.*, 1995; DUDLEY *et al.*, 2006a; MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003; NATARO *et al.*, 1992; WAI *et al.*, 1996).

A presença de fímbrias apresentando diferentes morfologias tem sido descrita em diversas amostras de EAEC, através de estudos de microscopia eletrônica de transmissão (VIAL *et al.*, 1988; KNUTTON *et al.*, 1992). Entretanto, apenas as estruturas fimbriais denominadas *Aggregative Adherence Factor* (AAF) I, II e III foram geneticamente caracterizadas (NATARO *et al.*, 1992, ELIAS *et al.*, 1999; BERNIER *et al.*, 2002). As fímbrias AAF/I, II e III são codificadas por plasmídeos que possuem em torno de 100 kb, e todas elas são requeridas para a expressão do fenótipo agregativo nas respectivas amostras protótipo.

A fímbria AAF/I é flexível e formada por feixes frouxos e medeia o padrão AA em células epiteliais (NATARO *et al.*, 1992). Os genes que codificam AAF/I na amostra protótipo 17-2 estão localizados no plasmídeo pAA1 e são separados em duas regiões (designadas região 1 e 2) por um segmento de DNA de aproximadamente 9 kb (NATARO *et al.*, 1992; NATARO *et al.*, 1994; SAVARINO *et al.*, 1994). A região 1 contém o cluster de quatro genes, *aggDCBA*, os quais codificam, a pilina da fímbria (AggA), uma proteína

críptica (AggB), a chaperonina (AggD), e o *usher* (AggC). A região 2 codifica um regulador homólogo a classe de proteínas reguladoras da transcrição da família AraC, denominado AggR, ativador transcricional necessário para a expressão dessa fímbria (NATARO *et al.*, 1994).

A fímbria AAF/II foi descrita na amostra protótipo 042 e é genética e morfologicamente distinta de AAF/I. Apresenta estrutura em forma de feixes semi-rígidos e medeia o padrão AA em células epiteliais (CZECZULIN *et al.*, 1997).

Os genes responsáveis pela biogênese de AAF/II também estão separados em duas regiões, porém sua organização é única, ou seja, os genes que codificam a chaperonina (*aafD*), a pilina (*aafA*), e o ativador transcricional (*aggR*) estão presentes na região 1, enquanto os genes que codificam o *usher* (*aafC*), e a invasina (*aafB*) estão localizados na região 2 (ELIAS *et al.*, 1999).

A terceira fímbria AAF foi identificada na amostra de EAEC 55989 por Bernier *et al.* (2002). AAF/III também está envolvida com a agregação das bactérias e sua adesão agregativa a células epiteliais, e sua biogênese é codificada pelo operon *agg-3*, o qual é bastante semelhante ao operon *afa* das adesinas AFA de *E. coli* uropatogênicas (SERVIN, 2005). Diferentemente de AAF/I e II, as quais formam feixes frouxos, AAF/III aparece em filamentos individuais longos e flexíveis. A organização do cluster AAF/III é muito similar à organização da AAF/I, constituído pelos genes *agg-3A*, *agg-3B*, *agg-3C*, *agg-3D*. Em uma região localizada 5 kb à jusante do gene *aggA*, se localiza um gene que possui homologia com o gene *aggR* (BERNIER *et al.*, 2002).

Adesinas não fimbriais, ou proteínas de membrana externa associadas ao padrão AA, têm sido evidenciadas em diversas amostras de EAEC pertencentes a distintos sorotipos (CHART *et al.*, 1995; DEBROY *et al.*, 1995; WAI *et al.*, 1996; MONTEIRO-NETO *et al.*, 1998, 2003). Debroy *et al.* (1995) e Wai *et al.* (1996), mostraram a presença de proteínas de membrana externa de 30 e 38 kDa, respectivamente, relacionadas ao fenótipo AA em amostras de EAEC. Monteiro-Neto *et al.* (2003) evidenciaram a participação de uma proteína de membrana externa de 58 kDa, denominada *aggregative protein 58* (Ap58) na adesão agregativa em amostras de *E. coli* do sorotipo O111:H12. O

gene que codifica essa adesina (*ap58*) foi localizado no cromossomo da amostra protótipo (MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003).

Foi demonstrado na amostra de EAEC atípica C1096 (sorotipo O4:HNT) isolada na Sérvia, que a adesão agregativa em células epiteliais cultivadas e superfícies abióticas era mediada por um pili do tipo IV, codificado por genes presentes em um plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncI1. O gene *pilS* codifica a pilina correspondente à subunidade principal do pili tipo IV descrito na amostra C1096. A expressão do pili tipo IV é necessária, mas não completamente responsável pela adesão agregativa (COBELJIC *et al.*, 1996; DUDLEY *et al.*, 2006a).

Recentemente, foi descrita uma nova adesina responsável pelo padrão AA em amostras de EAEC isoladas na Dinamarca, denominada Hda (BOISEN *et al.*, 2008). O gene *hdaA*, que codifica a pilina HdaA, é responsável pelo fenótipo agregativo em amostras de EAEC que não apresentam as adesinas fimbriais AAF. Esse gene parece ser também regulado por AggR (BOISEN *et al.*, 2008). A estrutura morfológica da adesina Hda não foi demonstrada por esses autores, embora o gene *hdaA* tenha sido previamente descrito no GenBank como codificando uma pilina hipotética relacionada à família Dr de adesinas (BOISEN *et al.*, 2008).

EAEC é considerado um enteropatógeno não invasor, entretanto, alguns pesquisadores têm sugerido que EAEC pode ser capaz de invadir, ou pelo menos, um grupo de EAEC pode apresentar o fenótipo invasivo (ABE *et al.*, 2001; BENJAMIN *et al.*, 1995; HARADA *et al.*, 2007; KOO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2008).

Benjamin *et al.* (1995), demonstraram que amostras de EAEC eram internalizadas por células HeLa e que essa internalização era mediada por componentes do citoesqueleto celular. Abe *et al.* (2001), utilizando a amostra de EAEC 236 (O111:H12), demonstraram um fenótipo de invasão em células T84 e biópsia de mucosa de cólon humano. Esta observação, associada ao fato de que crianças com diarreia causada por EAEC no México apresentavam sangue nas fezes (CRAVIOTO *et al.*, 1991), sugere que essa capacidade de invasão possa ser uma importante propriedade de virulência de algumas amostras da categoria.

Diversos autores descreveram a capacidade de amostras de EAEC, isoladas de casos de diarreia, em causar efeitos tóxicos em células epiteliais humanas cultivadas e também em mucosas (GOMES *et al.*, 1995; HENDERSON *et al.*, 1999; HICKS *et al.*, 1996; TZIPORI *et al.*, 1992; VIAL *et al.*, 1988; NAVARRO-GARCIA *et al.*, 1999).

Savarino *et al.* (1991) identificaram em amostras de EAEC uma enterotoxina termoestável denominada *E. coli heat-stable enterotoxin 1* (EAST1). Essa enterotoxina apresenta homologia significativa com o domínio enterotóxico da toxina ST de ETEC, sendo capaz de induzir um aumento da concentração de cGMP intracelular (SAVARINO *et al.*, 1993). O gene que codifica EAST1 (*astA*) está localizado no plasmídeo pAA2 da amostra 042 (CZECZULIN *et al.*, 1999). O papel de EAST1 na patogênese é questionável uma vez que a sua presença foi também detectada em amostras de *E. coli* não patogênicas (SAVARINO *et al.*, 1996). Foi descrita a ocorrência de pelo menos duas variantes naturais dessa enterotoxina: EAST-1 da amostra 17-2 e EAST-1 da amostra 042. Essa diferença reside na substituição de um aminoácido e confere maior capacidade toxigênica à toxina EAST-1 da amostra 042 (VEILLEUX *et al.*, 2008).

Navarro-Garcia *et al.* (1998) ao analisarem sobrenadantes de culturas de amostras de EAEC causadoras de um surto de diarreia no México, descreveram duas proteínas secretadas de 108 e 116 kDa com atividades citotóxicas. Ambas as proteínas foram caracterizadas como autotransportadoras e são clivadas antes de tornarem-se funcionais. Essas proteínas contêm o motivo de protease característico de todas as serino-proteases autotransportadoras da família Enterobacteriaceae (HENDERSON *et al.*, 1998).

Eslava *et al.* (1998) identificaram a enterotoxina de 108 kDa, capaz de causar acúmulo de fluido e lesões necróticas e hemorrágicas em alça ligada de rato, a qual foi denominada *plamid encoded toxin* (Pet). O gene que codifica essa toxina (*pet*) também foi localizado no plasmídeo pAA2 da amostra 042 (ELIAS *et al.*, 1999).

A outra proteína de 116 kDa foi identificada por Henderson *et al.* (1999) e denominada *protein involved in intestinal colonization* (Pic). Essa toxina apresenta atividade mucinolítica, de hemaglutinação e confere à

bactéria a capacidade de resistir à atividade bactericida do soro. Diferentemente de *pet*, o gene que codifica a proteína Pic (*pic*) está localizado no cromossomo da amostra protótipo 042 e a sua presença também foi detectada em *Shigella flexneri* 2a (HENDERSON *et al.*, 1999).

A toxina denominada ShET1 (*Shigella enterotoxin* 1) é codificada na fita anti-senso em relação ao gene *pic*. Os genes *setA* e *setB* codificam a holotoxina predita do tipo A1:B5 (FASANO *et al.*, 1995), que causa acúmulo de fluido em modelo *in vivo* de alça intestinal ligada de coelhos (HARRINGTON *et al.*, 2006). Enquanto ShET1 é uma enterotoxina, Pic possui atividade mucinolítica e de hemaglutinina (HENDERSON *et al.*, 1999). Esse locus não é exclusivo de EAEC, visto que os genes *pic/setBA* são encontrados também em *Shigella flexneri* 2a (FASANO *et al.*, 1995) e em *E. coli* uropatogênica (HEIMER *et al.*, 2004).

Além dos genes *pic* e *setAB*, que codificam as toxinas Pic e ShET1, respectivamente, no cromossomo da amostra 042 foi localizado o gene *irp-2* que codifica a proteína Lrp2.

O gene que codifica Lrp2 (*iron-repressible high-molecular weight protein* 2) está presente em uma ilha de patogenicidade do cromossomo de *Yersinia enterocolitica*, onde codifica uma proteína envolvida na biossíntese de um sideróforo (*yersiniabactina*), responsável pela captação de ferro neste gênero (SCHUBERT *et al.*, 1998). Esses mesmos autores relataram a presença do gene *irp-2* no cromossomo de 93% das amostras de EAEC estudadas, sendo raramente encontrada em EPEC, EIEC, ETEC e ausente em EHEC, *Shigella* spp. e *Salmonella* spp.

A análise do alinhamento da sequência da amostra 042, revelou que *pic/setBA* está localizado na ilha de patogenicidade (PAI) de 117 kb inserida no locus do tRNA *pheU* (DUDLEY *et al.*, 2006b). Al Hasani *et al.* (2001), determinaram que o locus *pic/setBA* está na PAI denominada *she* em *Shigella flexneri* YSH6000T, inserida ao lado do gene tRNA *pheV*. O elemento móvel IS que flanqueia esse gene em EAEC difere da sequência de inserção que o flanqueia na outra espécie, sugerindo que a aquisição foi distinta para essas duas espécies.

Essa PAI da amostra 042 localizada em *pheU* contém um grupo de genes regulados por AggR, os quais foram denominados *aai* (*AggR-activated*

island) (DUDLEY *et al.*, 2006b). Esse operon codifica genes envolvidos na secreção de pelo menos uma proteína e parece fazer parte do aparato de secreção da proteína AaiC. Outros autores têm descrito a presença de genes similares ao operon *aai* em outros organismos Gram-negativos patogênicos e bactérias simbiotes (FOLKESSON *et al.*, 2002; RAO *et al.*, 2004). Mais recentemente, o termo sistema de secreção do tipo 6 foi sugerido para a secreção de AaiC mediada pelo operon *aai* (PUKATZKI *et al.*, 2006). A contribuição dos genes *aaiA* para a patogênese de EAEC é desconhecida, porém esses genes não parecem ter uma função na aderência a superfícies ou a células do epitélio intestinal, como descrito previamente por genes regulados por AggR (DUDLEY *et al.*, 2006b).

Czeczulin *et al.* (1999) identificaram diversos genes cromossômicos e plasmidiais na amostra protótipo 042 associados à virulência de EAEC. Dentre os plasmidiais, além dos genes da biogênese de AAF/II (*aafA*, *aafC*, *aafD* e *aggR*), das toxinas Pet (*pet*) e EAST1 (*astA*) e da sequência correspondente ao fragmento sonda CVD432 (*aatA*), foram também identificados os genes denominados *aspU/aap*, *shf*, *capU* e *virK*.

Uma proteína de 10 kDa, a qual foi imunogênica em estudos com voluntários humanos, foi descrita por Czeczulin *et al.* (1999) como sendo codificada pelo gene *aspU* localizado no plasmídeo pAA2 da amostra 042. Sheikh *et al.* (2002) descreveram que *aspU* está sob controle do ativador transcricional *aggR* e alteraram a nomenclatura deste gene para *aap* (*anti-aggregation protein*). O produto de *aap*, denominado dispersina, possui uma sequência sinal e é secretado para o meio extracelular, onde permanece ligado ao lipopolissacarídeo da bactéria, neutralizando a carga negativa da superfície externa e permitindo a projeção das fímbrias (VELARDE *et al.*, 2007). Mutantes nesse gene possuem autoagregação muito intensa, indicando que a dispersina atua diminuindo a autoagregação e permitindo a dispersão da mesma na mucosa intestinal. A translocação da dispersina através da membrana externa está relacionada ao sistema de transporte do tipo ABC do qual *aatA* faz parte (NISHI *et al.*, 2003).

O seqüenciamento do plasmídeo pAA2 da amostra 042 revelou entre os genes *aafC* e *aatA* a presença de um grupo formado por três genes denominados *shf*, *capU* e *virK* (CZECZULIN *et al.*, 1999), o qual apresentou

alta similaridade com o mesmo grupo localizado no plasmídeo de virulência de *Shigella flexneri* (FUJIYAMA *et al.*, 2008). Esse grupo de genes foi denominado *cap cluster* (CZECZULIN *et al.*, 1999; RAJAKUMAR *et al.*, 1996).

O gene *capU* codifica uma proteína que apresenta 50% de identidade com uma proteína relacionada à biossíntese de lipopolissacarídeo de *E. coli* O157:H7 (CZECZULIN *et al.*, 1999). O gene *virK* foi sugerido como sendo um regulador pós-transcricional de *virG*, ambos localizados no plasmídeo de virulência de *Shigella flexneri* (NAKATA *et al.*, 1992).

O gene plasmidial *shf*, assim denominado por apresentar homologia com dois genes descritos em *Shigella flexneri* 2a (*shf1* e *shf2*), contém 842 pb e codifica uma proteína predita de 280 aminoácidos, com massa de 32,8 kDa, de função não estabelecida (CZECZULIN *et al.*, 1999). Homólogos de *shf* foram encontrados nos plasmídeos pO157 de EHEC O157:H7 e pCoo de ETEC (CZECZULIN *et al.*, 1999).

O gene *shf* foi encontrado em alta prevalência em amostras de EAEC isoladas em nosso meio (ELIAS *et al.*, 2002; PIVA *et al.*, 2003; ZAMBONI *et al.*, 2004) e no exterior (CZECZULIN *et al.*, 1999; OKEKE *et al.*, 2000; JENKINS *et al.*, 2006a). Entretanto poucos estudos avaliaram essa prevalência classificando as amostras de EAEC em típicas e atípicas.

A proteína predita codificada por *shf* apresenta 25% de similaridade com a proteína IcaB de *Staphylococcus epidermidis*, a qual possui relação na formação de biofilme nessa espécie, participando da biossíntese de um exopolissacarídeo responsável pela adesão célula-célula e pluriestratificação das bactérias no biofilme (HEILMANN *et al.*, 1996). O papel de *S. epidermidis* como patógeno humano tem sido demonstrado nos últimos anos principalmente pela associação com infecções persistentes associadas à formação de biofilme em cateteres (SPEZIALE *et al.*, 2008).

A capacidade de EAEC em formar biofilme *in vivo* foi descrita em cultura de biópsia de cólon humano e sugere uma relação com a persistência da diarreia (SHEIKH *et al.*, 2001). A participação da fímbria AAF/II e das proteínas Fis e YafK na formação desse biofilme de EAEC foi descrita por Sheikh *et al.* (2001), utilizando a amostra protótipo 042 cultivada em meio de cultura celular rico em glicose. O gene cromossômico *fis* codifica a proteína Fis envolvida na transcrição fase de crescimento dependente. YafK é uma

proteína hipotética de 28 kDa, codificada pelo gene *yafK* e requerida para a expressão de AAF/II a nível pós-transcricional (SHEIKH *et al.*, 2001). O envolvimento da fímbria tipo I no fenótipo de formação de biofilme em EAEC foi evidenciado por Moreira *et al.* (2003).

Alguns microrganismos ao invés de aderir individualmente possuem a capacidade de adesão formando aglomerados bacterianos. Portanto, o biofilme nada mais é que camadas múltiplas de bactérias, em associação ou não com outros microrganismos aderidos a diferentes tipos de superfície, como plástico, vidro, metal, entre outros materiais (DONLAN, 2002). Os biofilmes são também comunidades bacterianas aderidas a superfícies vivas, como por exemplo os biofilmes que formam a placa bacteriana. Os biofilmes podem ser formados por uma única espécie, bem como por interações entre diversas espécies bacterianas (WHITTAKER *et al.*, 1996).

A importância médica da formação dos biofilmes bacterianos reside no fato destes serem usualmente relacionados a infecções persistentes, como nos casos de infecções de implantes cirúrgicos e em cateteres, sendo uma causa comum de infecções hospitalares (DONLAN; COSTERTON, 2002). A dificuldade de tratamento adequado para infecções persistentes causadas a partir da formação de biofilmes, está diretamente relacionada à estrutura compacta dos mesmos, onde substâncias tóxicas às células bacterianas, como por exemplo os antibióticos, enfrentam dificuldades para penetrar no biofilme bacteriano (COSTERTON *et al.*, 1999; STEWART; COSTERTON, 2001).

A produção de uma mistura extracelular de polímeros de açúcar denominados exopolissacarídeos, é característico e crítico para a formação de biofilmes bacterianos, sendo o principal componente da sua matriz (WATNICK, KOLTER, 2000). Estudos demonstraram que a proteína IcaB de *S. epidermidis* é responsável pela desacetilação da molécula poli-N-acetilglucosamina, formando uma molécula exopolissacarídica presente em muitos microrganismos, e que participa da formação do biofilme (VUONG *et al.*, 2004).

Embora a função da proteína Shf não seja conhecida, a sua homologia com IcaB sugere uma possível participação na formação de biofilme e conseqüentemente na adesão agregativa de EAEC. Desta forma, a investigação da participação de Shf nesses fenótipos em amostras de EAEC

típica e atípica é justificável. Além disso, como a investigação da prevalência de *shf* em coleções de EAEC classificadas como típica ou atípica é escassa, essa pesquisa em amostras isoladas de casos de diarreia em nosso país é importante e auxiliará na compreensão dos mecanismos de virulência de EAEC típica e atípica.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Determinar a prevalência do gene *shf* em amostras de EAEC típicas e atípicas recentemente isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda na infância na cidade de Salvador (BA).
- Avaliar o envolvimento da proteína Shf no estabelecimento da adesão agregativa e na capacidade de formação de biofilme de EAEC típica e atípica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura utilizados para o cultivo e manutenção das amostras bacterianas, assim como as soluções utilizadas nas diversas técnicas descritas a seguir, foram preparados de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Exceto quando indicado, os meios de cultivo bacteriano foram de procedência Difco® (Difco, Reino Unido) e os sais e reagentes de procedência Merck® (Merck, Alemanha) ou Sigma® (Sigma, EUA).

3.2 Amostras bacterianas

Foram empregadas neste estudo as amostras de EAEC 042 e 2871-1, classificadas respectivamente como típica e atípica. A amostra 042 (sorotipo O44:H18) foi isolada de um caso de diarreia no Peru (NATARO *et al.*, 1985), apresenta o padrão de adesão agregativa típico e tem sido amplamente empregada na caracterização dos fatores de virulência descritos em EAEC. A amostra 2871-1 (sorotipo O4:H33) foi isolada de um caso de diarreia em São Paulo (GOMES *et al.*, 1998), apresenta o padrão de adesão agregativa típico e foi caracterizada como desprovida de todos os marcadores de virulência de EAEC, apresentando apenas o gene *shf* (ELIAS *et al.*, 2002). Essas amostras foram classificadas como típica e atípica pela presença e ausência do gene *aggR*, respectivamente (HARRINGTON *et al.*, 2006).

Como controles positivos nas reações de PCR foram empregadas as seguintes amostras de EAEC: 042 (sorotipo O44:H18), nas reações de amplificação de *aaiA*, *aggR*, *shf*, *shf_{cloning}*, *capU* e *virK*; C1096 (sorotipo O4:HNT), nas reações de amplificação de *pilS* (COBELJIC *et al.*, 1996); RN785-1 (sorotipo O1:HNT), nas reações de amplificação de *agg3A* (ZAMBONI *et al.*, 2004); e A30 (sorogrupo O75), nas reações de amplificação de *agg3C* (LABIGNE-ROUSSEL; FALKOW, 1988). Como controle negativo foi utilizada a amostra de *E. coli* DH5α (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Os vetores plasmidiais e os plasmídeos recombinantes utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 1, juntamente com as suas respectivas amostras hospedeiras.

Para determinar a prevalência do gene *shf* em amostras de EAEC foram empregadas 113 amostras isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da doença diarréica aguda, conduzido na cidade de Salvador (BA) (BUERIS *et al.*, 2007). Nesse estudo EAEC esteve associada à diarreia aguda tendo sido o patógeno bacteriano mais prevalente (BUERIS *et al.*, 2007). Dentre essas 113 amostras, apenas as positivas para o gene *shf* foram empregadas nos ensaio de formação de biofilme e de adesão a células HEp-2.

Tabela 1 – Características dos plasmídeos empregados neste estudo

Plasmídeo	Características relevantes	Hospedeira	Referência ou origem
pGEM-T Easy	Plasmídeo vetor de alto número de cópias; 3,0 kb; Amp ^a	<i>E. coli</i> JM109	Promega (EUA)
pJP5603	Plasmídeo vetor suicida de baixo número de cópias contendo o replicon R6K; 3,1 kb; Cm ^b	<i>E. coli</i> DH5 α <i>pir</i>	PENFOLD; PEMBERTON, 1992
pFV2	Fragmento interno do gene <i>shf</i> (613 pb) clonado no sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM-T Easy; 3,6 kb; Amp ^a	<i>E. coli</i> JM109	Este estudo
pFV3	Fragmento <i>shf</i> do plasmídeo pFV2 subclonado no sítio de <i>EcoRI</i> do vetor pJP5603; 3,7 kb; Cm ^b	<i>E. coli</i> DH5 α <i>pir</i>	Este estudo

^a Amp, resistência à ampicilina.

^b Cm, resistência à canamicina.

3.3 Sorogrupagem das amostras de EAEC

As amostras de EAEC isoladas no estudo epidemiológico realizado na cidade de Salvador (BA) que apresentaram o gene *shf* foram submetidas à tipagem do antígeno O, empregando os antissoros específicos de O1 a O181. Dentre as 41 amostras de EAEC *shf*⁺, 28 foram sorogrupadas pela Dra. Carla

R. Taddei (Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo) com os antissoros adquiridos do Laboratório de Referência de *Escherichia coli* da Universidade de Santiago de Compostela (Lugo, Espanha), seguindo a técnica descrita por Guinée (1981). As outras 13 EAEC *shf*⁺ foram gentilmente sorogrupadas pela Dra. Kinue Irino (Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo) empregando os antissoros preparados pelo Instituto Adolfo Lutz e a metodologia descrita por Ewing (1986).

3.4 Pesquisa dos genes de virulência de EAEC

3.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi empregada na pesquisa da presença dos seguintes marcadores de virulência de EAEC na amostra 2871-1 (EAEC atípica): *aaiA*, *capU*, *virK*, *pilS*, *agg3A* e *agg3C* (BERNIER *et al.*, 2002; CZECHULIN *et al.*, 1999; DUDLEY *et al.*, 2006a; DUDLEY *et al.*, 2006b). Essa técnica também foi utilizada para a confirmação da presença do gene *shf* (CZECHULIN *et al.*, 1999) nas amostras protótipo de EAEC deste estudo (042 e 2871-1), para a pesquisa da presença do gene *shf* na coleção de amostras de EAEC isolada na cidade de Salvador e para a pesquisa da presença do gene *aggR* nas amostras dessa coleção que albergaram o gene *shf*. Além disso, através de PCR o fragmento interno referente ao gene *shf* foi amplificado para posterior clonagem nos vetores utilizados nos experimentos de mutagênese.

Os pares de iniciadores e os ciclos de amplificação utilizados, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados nas reações de PCR deste estudo encontram-se descritos na Tabela 2. Os lisados bacterianos usados como DNA molde foram obtidos da seguinte forma: uma colônia isolada de uma placa de ágar Luria-Bertani (LB) foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 500 µL de água deionizada estéril, submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo. Para cada reação foram utilizados 0,2 µM de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 1 µL do DNA molde e os seguintes reagentes de procedência Invitrogen® (Invitrogen,

EUA): 2,5 U de Taq DNA Polymerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, tampão de PCR 1x e 0,2 mM da mistura de dNTPs.

Tabela 2 - Seqüência dos iniciadores, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR deste estudo

Gene	Seqüências dos iniciadores ^a	Ciclo de amplificação	Amplicon	Referência
<i>shf</i>	(F) ATGAATTCCACTTTCTCCCGAGACATTC (R) ATGTCGACCCTTTAGCGGGAGCATTTCAT	30x (1 min 94 °C, 1 min 51 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	613 pb	CZECZULIN <i>et al.</i> , 1999
<i>shf_{cloning}</i>	(F) ATGAATTCATGTTAAACGGAGGG (R) ATGTCGACTTAGTCATCCGGTAA	30x (1 min 94 °C, 1 min 58 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	843 pb	Este estudo ^b
<i>pilS</i>	(F) ATGAGCGTCATAACCTGTTC (R) CTGTTGGTTTCCAGTTTGAT	30x (1 min 94 °C, 1 min 50 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	534 pb	DUDLEY <i>et al.</i> , 2006a
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGAGTACCAGATAACG (R) GTTTTCAGGATTGCCATTAG	25x (45 seg 94 °C, 30 seg 50 °C, 1 min 74 °C), 8 min 72 °C	476 pb	DUDLEY <i>et al.</i> , 2006b
<i>agg3A</i>	(F) GGTAACAAGGGAAATATTAGC (R) GCCCGAAAAATGTCCAGTAT	30x (1 min 94 °C, 1 min 60 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	462 pb	BERNIER <i>et al.</i> , 2002
<i>agg3C</i>	(F) GTTTGGAACCGGGAATTAACATTG (R) ATACTTTAGATACCCCTCACGCAG	30x (1 min 94 °C, 1 min 65 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	485 pb	BERNIER <i>et al.</i> , 2002
<i>aggR</i>	(F) CTAATTGTACAATCGATGTA (R) ATGAAGTAATTCTTGAAT	30x (1 min 94 °C, 1 min 40 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	308 pb	CZECZULIN <i>et al.</i> , 1999
<i>virK</i>	(F) ATGTTTTCTATAAGTAACTTATCATTTATCGG (R) TTAATTTGAATTCTGATGTTCTGAG	30x (30 seg 94 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	951 pb	FUJIYAMA <i>et al.</i> , 2008
<i>capU</i>	(F) ATGAATATACTATTTACGGAATC (R) CTACAGGCACAGAAAATGCCGATG	30x (30 seg 94 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	822 pb	FUJIYAMA <i>et al.</i> , 2008

^a (F), iniciador *forward*; (R), iniciador *reverse*.

^b Iniciadores baseados na seqüência do gene *shf* depositada no GenBank (número de acesso: AF134403).

3.4.2 Eletroforese em gel de agarose

Após amplificação, os produtos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. Os géis foram preparados por aquecimento,

fundindo-se agarose (Invitrogen) em tampão TBE 0,5x (tris(hidroximetil)aminometano [Tris-HCl] 44,5 mM; ácido bórico 44,5 mM; ácido etilenodiaminotetracético [EDTA] 1mM), em concentrações finais variadas de (0,7 a 1,0%, dependendo do tamanho do fragmento analisado). As amostras de DNA resultantes das PCR foram acrescidas de tampão de amostra 1x (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%). Como marcador de peso molecular foi utilizado o *1kb DNA Ladder* (Invitrogen), e de concentração de DNA o *Low Mass DNA Marker* (Invitrogen). Após a corrida eletroforética, realizada sob corrente constante de 80 V em tampão TBE (0,5x), os géis foram corados em solução de brometo de etídio na concentração de 10 µg/mL durante 10 min, observados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram registradas através do sistema de captação de imagem Alphamager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

3.5 Ensaio de adesão em células HEp-2

3.5.1 Cultivo das células e preparo das microplacas

As células HEp-2 foram cultivadas em garrafas de 50 mL (Nunc, EUA) contendo 12 mL de Meio Mínimo Essencial de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM; Cultilab, Brasil) contendo antibióticos (penicilina, 1000 U/mL; estreptomicina, 1 mg/mL), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab), e mantidas por 2 a 3 dias a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período de incubação, as células foram transferidas para placas de 24 orifícios contendo lamínulas de vidro, em uma concentração de 5×10^4 células/mL, e incubadas por 48h sob as mesmas condições, até que atingissem a confluência de 75%.

3.5.2 Ensaio da adesão

O teste de interação com células epiteliais HEp-2 foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Cravioto *et al.* (1979), com algumas modificações. As amostras bacterianas selvagens selecionadas para esse estudo foram inoculadas em 3 mL de caldo de soja tripticase (TSB) e as

respectivas amostras mutantes em 3 mL de caldo TSB contendo canamicina (50 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e ácido nalidíxico (50 µg/mL), e incubadas sem agitação a 37 °C por 18h. Uma alíquota de 20 µL da cultura bacteriana da amostra selvagem ou 40 µL das amostras mutantes foram adicionadas a cada orifício da placa contendo a cultura de células HEp-2, previamente lavadas por cinco vezes com tampão salina-fosfato (PBS) 1x (cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio dibásico 8,1 mM; fosfato de potássio monobásico 1,5 mM; pH 7,4) e acrescidas de 980 ou 960 µL de meio DMEM sem antibiótico, contendo 2% de SFB e 1% de D-manose. Após incubação por 3 ou 6h a 37 °C, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes com PBS 1x, a fim de remover as bactérias que não aderiram às células. Nos ensaios de 3h, as células foram em seguida fixadas com metanol absoluto. Nos ensaios de 6h, após as três primeiras horas de incubação, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS, acrescidas de 1 mL de meio DMEM sem antibiótico (2% de SFB e 1% de D-manose), e incubadas por mais 3h a 37 °C. Em seguida, foram novamente lavadas por cinco vezes com PBS e fixadas com metanol absoluto. Após a fixação, as células foram coradas por 5 min com solução corante eosina-azul de metileno em solução a 0,2% segundo May-Grünwald (Merck) diluído na razão 1:2 em tampão de Sørensen (fosfato de potássio monobásico 8,6 mM; fosfato de sódio dibásico 28,6 mM), e em seguida esse corante foi desprezado sendo então acrescentada a solução corante azur-eosina-azul de metileno segundo Giemsa (Merck) diluída na razão 1:3 em tampão de Sørensen, por 20 min. Após lavagem para retirada do excesso de corante, as lamínulas foram secas em temperatura ambiente e montadas em lâminas para microscopia com Entellan (Merck). As lâminas foram analisadas através de microscopia óptica comum, em aumento de 1.000 vezes.

3.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro*

A quantificação da formação de biofilme foi realizada segundo o protocolo descrito por Sheikh *et al.* (2001), apresentado a seguir. As amostras bacterianas foram cultivadas em 3 mL de caldo LB a 37 °C sem agitação durante 18h. A partir deste cultivo, 2 µL foram inoculados em 200 µL de meio

DMEM (Cultilab), suplementado com 0,4% de glicose, em placas de poliestireno de fundo redondo de 96 poços. Após incubação a 37 °C durante 24h o meio de cultura foi aspirado e os poços foram lavados gentilmente por três vezes com tampão PBS. O biofilme foi corado com solução de cristal-violeta a 0,5% por 5 min e a placa foi seca à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de etanol 95% foram adicionados a cada um dos poços para solubilização do corante e após 2 min à temperatura ambiente, 150 µL desse volume foram transferidos para outra placa de poliestireno, para leitura da absorbância de cada poço em comprimento de onda de 595 nm no leitor de ELISA Multiskan EX (Labsystems, EUA). As amostras de EAEC 042 e *E. coli* DH5α foram empregadas como controles positivo e negativo de formação de biofilme, respectivamente.

3.7 Mutação do gene *shf* nas amostras 042 e 2871-1

Para a mutagênese no gene *shf* foi utilizada a estratégia de mutação não polar empregando o vetor suicida pJP5603 (PENFOLD; PEMBERTON, 1992). Em resumo, um fragmento interno do gene *shf* foi clonado neste vetor e transformado em uma amostra de *E. coli* lisogenizada com o fago lambda (*E. coli* DH5αλ*pir*). Em seguida essa amostra foi conjugada com as amostras selvagens e, através de recombinação homóloga, ocorreu a inserção do plasmídeo recombinante pJP5603 no gene *shf* provocando a inativação do mesmo. Para a realização desta metodologia é necessário que as amostras selvagens apresentem resistência a algum antibiótico para seleção após a etapa de conjugação. A amostra 042 apresenta resistência natural aos antibióticos tetraciclina, estreptomicina e cloranfenicol. Já a amostra 2871-1 não apresentou resistência a nenhum dos antibióticos comercialmente disponíveis (dados não apresentados). Por esse motivo, foi necessário selecionar um mutante espontâneo ao ácido nalidíxico da amostra 2871-1.

3.7.1 Obtenção da amostra 2871-1 resistente ao ácido nalidíxico

A amostra 2871-1 selvagem foi cultivada em 100 mL de caldo LB sem adição de antibiótico a 37 °C sob agitação de 250 rpm durante 18h. A seguir,

esse cultivo foi centrifugado por 15 min a 4.000 g na centrífuga Himac CR21E (Hitachi, Japão) e o sedimento ressuspensão em 5 ml de tampão PBS 1x. Um mL dessa suspensão foi semeado em placas de ágar LB com adição de 50 µg/mL de ácido nalidíxico e as placas foram incubadas por 18h a 37 °C. Após essa incubação, colônias de mutantes espontâneos resistentes ao ácido nalidíxico foram selecionadas e analisadas através de testes bioquímicos para confirmação da espécie *E. coli* (BOPP *et al.*, 1999).

Após a obtenção do mutante, a sua curva de crescimento em caldo TSB foi avaliada em comparação à amostra selvagem, com a finalidade de demonstrar que a mutação que resultou na resistência ao ácido nalidíxico não alterou o seu padrão de crescimento.

As curvas de crescimento da amostra protótipo 2871-1 e da 2871-1 resistente a ácido nalidíxico (2871-1/Nal), foram obtidas correlacionando as leituras de absorbância dos meios de cultura em determinados intervalos de tempo, segundo as condições de cultivo descritas a seguir. Inicialmente a amostra protótipo foi cultivada em 3 mL de caldo TSB e a mutante em 3 mL de caldo TSB acrescido de 50 µg/mL de ácido nalidíxico, ambas a 37 °C por 18h. Uma alíquota de 1 mL dessas culturas foi em seguida transferida a 100 mL de TSB ou TSB acrescido de ácido nalidíxico (para a amostra mutante) e esses meios foram incubados a 37 °C sob agitação de 300 rpm. O crescimento bacteriano de cada uma das amostras foi monitorado a cada 30 min durante 8h, através de leituras de absorbância em comprimento de onda de 600 nm, utilizando o espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, EUA).

3.7.2 Clonagem do gene *shf* no vetor de clonagem pGEM-T Easy

3.7.2.1 Obtenção do inserto *shf*

O gene *shf* foi inicialmente clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) para posterior clonagem no vetor pJP5603. O fragmento interno do gene *shf* de 613 pb, foi amplificado através de PCR (item 3.4.1) a partir do DNA da amostra 042, utilizando os iniciadores *shf*(F) e *shf*(R) (Tabela 2). Após a eletroforese em gel de agarose (item 3.4.2), o fragmento amplificado foi excisado do gel e foi purificado com auxílio do *DNA and Gel Band Purification*

Kit (GE Healthcare, Reino Unido). A quantificação foi realizada comparando-se a intensidade da banda obtida com as bandas do marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose a 1% (item 3.4.2).

3.7.2.2 Ligação do inserto ao vetor pGEM-T Easy

O inserto do fragmento interno do gene *shf* de 613 pb, obtido a partir da amostra 042 foi clonado no vetor comercial pGEM-T Easy (Promega), segundo recomendações do fabricante. A quantidade de inserto adicionado à mistura foi calculada de forma que representasse aproximadamente três vezes a concentração do vetor. A reação de ligação foi incubada por 18h à temperatura ambiente.

3.7.2.3 Transformação através de eletroporação

Para a eletroporação das reações de ligação descritas anteriormente, as células eletrocompetentes foram preparadas conforme descrição a seguir. A amostra de *E. coli* JM109 foi pré-cultivada em 3 mL de caldo LB durante 18h a 37 °C, sob agitação constante de 300 rpm. Uma alíquota de 2 mL de pré-inóculo da amostra foi transferida para 250 mL de caldo LB e a cultura cultivada sob as mesmas condições anteriores, até atingir a absorbância de 0,5 a 0,6 em comprimento de onda de 600 nm, determinada no espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech).

As células bacterianas JM109 foram então incubadas em banho de gelo por 15 min, transferidas para um tubo de centrifugação pré-resfriado e centrifugadas na centrífuga Himac CR21E (Hitachi), por 20 min a 5.000 g sob refrigeração de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com 250 mL de água deionizada estéril resfriada a 4 °C. As células foram gentilmente ressuspensas em 30 mL de glicerol a 10% resfriado a 4 °C e novamente centrifugadas a 5.000 g por 10 min sob refrigeração a 4 °C com auxílio da centrífuga Himac CR21E (Hitachi). Ao sedimento bacteriano foram adicionados 300 µL de glicerol a 10% resfriado a 4 °C para ressuspender gentilmente as células bacterianas. Essa suspensão foi alíquotada em

volumes de 50 µL em tubos de polipropileno de 1,5 ml pré-resfriados e imediatamente congeladas a – 80 °C.

Para a transformação, as células competentes foram descongeladas em banho de gelo e 3 µL da reação de ligação (item 3.7.2.2) foram adicionados a 50 µL de células competentes descongeladas em banho de gelo. Essas misturas foram transferidas para cubetas apropriadas de 0,2 cm (Biorad, EUA) previamente resfriadas e eletroporadas utilizando o eletroporador GenePulser (Biorad), sob as condições de 2,5 kV, 25 µF e controle de pulso a 200 Ω.

Após a eletroporação, foi adicionado imediatamente 1 mL de meio SOC (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; cloreto de sódio 10 mM; cloreto de potássio 2,5 mM; sulfato de magnésio 20 mM; cloreto de magnésio 10 mM; glicose 20 mM) à reação, e a mesma foi incubada a 37 °C durante 1h sob agitação de 250 rpm. A suspensão foi semeada em volumes de 100, 200 e 300 µL em placas de ágar LB acrescido de 40 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-Gal), 1 mM de isopropil- β-D-tiogalactosidase (IPTG) e 100 µg/mL de ampicilina, sendo em seguida incubadas a 37 °C por 18h.

3.7.2.4 Seleção do clone contendo o inserto *shf* no vetor pGEM-T Easy

As colônias recombinantes que apresentaram resistência à ampicilina e não metabolizaram o X-Gal (colônias brancas) foram selecionadas para confirmação da clonagem do gene *shf*, através de uma PCR (item 3.4.1) com os iniciadores *shf*(F) e *shf*(R). Após análise em eletroforese em gel de agarose (item 3.4.2), uma amostra apresentando o amplicon correspondente ao gene *shf* foi selecionada para o cultivo em caldo LB contendo ampicilina, sendo em seguida mantida a - 80 °C com 15% de glicerol acrescido ao cultivo. Essa amostra foi denominada JM109(pFV2).

O plasmídeo pFV2 foi submetido à extração do DNA plasmidial utilizando-se o *Quiagen plasmid mini kit* (Quiagen, EUA), a partir de um cultivo a 37 °C sob agitação de 300 rpm em 10 mL de caldo LB contendo ampicilina (100 µg/mL), segundo recomendações do fabricante. O plasmídeo pFV2 extraído foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 1% (item

3.4.2) e em seguida foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen), em volume de 20 µL contendo 1 µg do DNA plasmidial e 1 U da enzima. As reações foram realizadas empregando-se o tampão apropriado, de acordo com as recomendações do fabricante, durante 3h de incubação a 37 °C. Em seguida as digestões foram avaliadas através da corrida eletroforética em gel de agarose a 1% (item 3.4.2). Após confirmação da digestão, os fragmentos contendo as regiões flanqueadas pelas seqüências de restrição para *EcoRI*, foram purificados a partir do gel utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados. Os fragmentos foram mantidos a –20 °C para posterior clonagem no vetor suicida pJP5603.

3.7.3 Subclonagem do inserto *shf* no vetor pJP5603

O plasmídeo pJP5603 foi extraído da amostra hospedeira, com auxílio do *Quiagen plasmid midi kit* (Quiagen), a partir de um volume de 100 mL de cultura em caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL). O plasmídeo extraído foi digerido com a enzima *EcoRI*, seguindo as recomendações do fabricante, e em seguida quantificado em gel de agarose a 0,8%, comparando-se a intensidade da banda obtida com o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

3.7.3.1 Ligação do inserto ao vetor pJP5603

O inserto flanqueado pela região de restrição para a enzima *EcoRI* foi liberado do vetor pGEM-T Easy e religado ao vetor pJP5603 utilizando a T4 DNA ligase (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. A concentração de inserto utilizada foi cerca de 5 vezes maior que a concentração do vetor. A reação de ligação foi incubada por 18h a 16 °C.

3.7.3.2 Transformação por eletroporação

A amostra de *E. coli* DH5α λ pir foi cultivada em 3 mL de caldo LB acrescido de canamicina (50 µg/mL) por 18h a 37 °C, sob agitação constante de 250 rpm. Uma alíquota de 2 mL de pré-inóculo da amostra foi transferida

para 250 mL de caldo LB com canamicina (50 µg/mL), e a cultura cultivada sob as mesmas condições anteriores, até atingir a absorbância de 0,5 a 0,6 em comprimento de onda de 600 nm, determinada no espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech).

O preparo das células competentes e o protocolo de eletroporação ocorreram conforme descrito no item 3.7.2.3. As bactérias transformadas foram semeadas em placas de ágar LB acrescidas de canamicina (50 µg/ml) em volumes de 100, 200 e 300 µL da suspensão bacteriana e foram incubadas por 18h a 37 °C.

3.7.3.3 Seleção do clone contendo o inserto *shf* no vetor pJP5603

As colônias recombinantes que apresentaram resistência à canamicina foram selecionadas para confirmação da clonagem do gene *shf*, através de uma PCR (item 3.4.1) com os iniciadores *shf*(F) e *shf*(R) (Tabela 2). Após análise em eletroforese em gel de agarose a 1% (item 3.4.2), uma amostra apresentando o amplicon correspondente ao gene *shf* foi selecionada para o cultivo em caldo LB contendo canamicina, sendo em seguida mantida a - 80 °C com 15% de glicerol acrescido ao cultivo. Essa amostra foi denominada DH5α*pir*(pFV3).

3.7.4 Conjugação da amostra DH5α*pir*(pFV3) com as amostras de EAEC típica e atípica

As amostras DH5α*pir* (pFV3), 042 e 2871-1/Nal foram cultivadas por 18h a 37 °C em 3 mL de caldo LB contendo canamicina (50 µg/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e ácido nalidíxico (50 µg/ml), respectivamente. A seguir, 300 µL do cultivo da amostra doadora DH5α*pir*(pFV3) foram adicionados a 100 µL de cada uma das amostras receptoras em tubos de polipropileno de 1,5 ml e homogeneizados vagarosamente. Em seguida uma alíquota de 400 µL de cada suspensão bacteriana foi aplicada sobre membranas filtrantes de nitrocelulose (poros de 0,22 µm) estéreis, dispostas sobre placas de ágar LB sem adição de antibiótico, e incubada por 18h a 37

°C. Após a incubação, as membranas foram retiradas das placas, transferidas para tubos de polipropileno de 50 ml contendo 30 ml de tampão PBS estéril e os tubos foram agitados vigorosamente com auxílio do agitador Fisher Vortex Genie 2 (Fischer Scientific, EUA). A partir dessa suspensão bacteriana foram semeados 50, 100, 200 e 300 µL em placas de ágar LB contendo canamicina e estreptomicina (para seleção do transconjugante da amostra 042) ou canamicina e ácido nalidíxico (para seleção do transconjugante da amostra 2871-1/Nal). Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C durante 18h.

Dez transconjugantes de cada conjugação foram selecionados e avaliados inicialmente através de testes bioquímicos para identificação da espécie *E. coli* e da capacidade de fermentação da lactose, através do cultivo em ágar MacConkey (BOPP *et al.*, 1999). Além disso, a resistência aos antibióticos canamicina e estreptomicina (para o transconjugante da amostra 042) e canamicina e ácido nalidíxico (para seleção do transconjugante da amostra 2871-1/Nal) foram confirmados. Em seguida, a correta inserção do plasmídeo recombinante no gene *shf* das amostras selvagens foi verificada nos transconjugantes através de PCR (item 3.4.1), com os iniciadores *shf_{cloning}* (F e R), descritos na Tabela 2. Essa combinação de iniciadores amplifica no controle positivo (EAEAC 042) um fragmento de 843 pb a partir do codon de iniciação (ATG) até o codon de terminação do gene *shf*. As amplificações dos fragmentos das PCR foram avaliadas através de gel de agarose 0,8% (item 3.4.2).

Os transconjugantes selecionados foram denominados 042::pFV3 e 2871-1/Nal::pFV3 e mantidos a – 80 °C em caldo LB contendo os antibióticos apropriados e 15% de glicerol.

4 RESULTADOS

4.1 Prevalência do gene *shf* em amostras de EAEC isoladas de crianças com diarreia

Com a finalidade de determinar a prevalência de *shf* em amostras recentemente isoladas de casos de diarreia no Brasil, foram estudadas 113 amostras de EAEC isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda realizado na cidade de Salvador, Bahia (BUERIS *et al.*, 2007). Essas amostras foram isoladas apenas de pacientes apresentando diarreia (casos) da faixa etária entre 1 e 10 anos, e foram previamente determinadas como EAEC através da reatividade com a sonda genética CVD432 (*aatA*), utilizada para o diagnóstico de EAEC (HARRINGTON *et al.*, 2006).

Dentre as 113 amostras de EAEC avaliadas, 41 (36,3%) foram positivas para o gene *shf*. Para a análise da prevalência de *shf* nos subgrupos de EAEC típica e atípica essas 113 amostras foram analisadas quanto à presença ou ausência do gene *aggR*. Nessa classificação 67 amostras foram determinadas como típicas e 46 como atípicas e o gene *shf* foi encontrado em 25 amostras do primeiro grupo e 16 amostras do segundo grupo. Em resumo, o gene *shf* foi detectado em 37,3% das amostras de EAEC típica e 34,8% das amostras de EAEC atípicas.

4.2 Caracterização fenotípica das amostras de EAEC positivas para o gene *shf*

Essas 41 amostras positivas para *shf* foram em seguida avaliadas quanto ao sorogrupo (tipagem do antígeno O), padrão de adesão em células HEp-2 e capacidade de formação de biofilme em poliestireno. Uma vez que não houve diferenças quando esses resultados foram avaliados comparando-se os grupos de típica e atípica, os mesmos foram analisados em conjunto e estão apresentados na Tabela 3 e Figura 1.

Dentre as 41 amostras *shf* positivas, 2 apresentaram o antígeno O rugoso, 9 não aglutinaram com nenhum dos antissoros disponíveis (antígeno O não-tipável), e as outras 30 apresentaram sorogrupos diversos variando de

O3 a O181. Em resumo, 21 distintos sorogrupos foram determinados, sem prevalência de nenhum.

Com relação aos padrões de adesão em células HEp-2, 32 (78,1%) apresentaram o padrão de adesão agregativo, 3 (7,3%) apresentaram o padrão difuso e 6 (14,6%) não aderiram às células HEp-2.

A capacidade de formação de biofilme em poliestireno foi observada em todas as amostras de EAEC que albergam o gene *shf*. A maioria das amostras (80,5%) foi capaz de formar biofilmes densos, indicados por altas absorbâncias, ao passo que oito amostras (19,5%) formaram biofilmes menos densos (Tabela 3). As amostras positivas apresentaram absorbâncias similares às apresentadas pela amostra protótipo 042. Esses resultados podem ser observados individualmente na Figura 1 e em associação com os padrões de adesão e sorogrupo na Tabela 3. Ao analisar o gráfico da formação de biofilme (Figura 1), observa-se que não houve uma diferença significativa da capacidade de formação de biofilme entre as amostras típicas ou atípicas.

Tabela 3 – Análise das amostras de EAEC *shf*⁺ quanto aos sorogrupos, padrões de adesão, capacidade de formação de biofilme e presença do gene *aggR*

Nº da amostra	Sorogrupo	Padrão de adesão em células HEp-2	Presença do gene <i>aggR</i>	Absorbância do teste de formação de biofilme
114	O71	NA	-	2,237
128	O59	AA	-	1,784
198	O73	AA	+	2,277
208	ONT	AA	+	0,432
218	O33	AA	+	2,618
381	ONT	AA	+	1,609
732	O17	AA	+	2,027
856	O86	AA	+	1,807
871	O33	AA	+	2,826
934	O78	AA	+	1,509
963	ONT	AA	-	1,788
975	O78	AA	+	1,966
1005	OR	AA	-	3,106
1024	O44	AA	+	0,915
1116	O59	NA	+	1,509
1178	O175	AA	-	2,492
1226	O33	AA	-	2,325
1521	O3	DA	-	0,842
1539	O84	AA	+	2,329
1599	O5	AA	+	2,974
1643	ONT	DA	-	2,689
1678	O106	AA	+	3,252
1751	O15	DA	+	1,715
1757	O3	AA	+	1,326
2007	O104	AA	+	2,112
2024	ONT	NA	-	1,165
2225	O131	AA	+	3,141
2754	OR	AA	+	0,561
2872	O181	AA	-	1,915
3043	O73	NA	-	2,372
3125	O165	AA	-	0,764
3163	O126	NA	+	2,504
3233	O175	AA	-	2,883
3601	O154	AA	+	3,302
3616	ONT	AA	-	2,420
3755	O33	AA	+	2,279
3807	O175	AA	+	2,247
3826	O104	AA	+	2,567
3954	ONT	AA	+	2,914
4028	ONT	NA	-	0,874
4067	ONT	AA	+	0,924

ONT, antígeno O não tipável; OR, antígeno O rugoso; NA, não aderente; AA, adesão agregativa; DA, adesão difusa.

Figura 1 – Capacidade de formação de biofilme em poliestireno apresentada pelas amostras de EAEC típicas e atípicas que albergam o gene *shf*. Gráfico das absorvâncias em comprimento de onda de 595 nm das suspensões de cristal violeta em etanol 95%, correspondentes às colorações dos biofilmes formados nas placas de poliestireno após incubação das bactérias em meio DMEM com 0,4% de glicose a 37 °C em condições estáticas por 24h. A amostra de EAEC típica 042 foi usada como controle positivo e a amostra *E. coli* DH5α como controle negativo. O gráfico mostra os resultados das amostras típicas e atípicas separadamente, onde no primeiro grupo estão as amostras típicas e no segundo grupo, a partir da amostra 2871-1 (EAEC atípica), as amostras atípicas.

4.3 Caracterização fenotípica das amostras de EAEC típica e atípica selecionadas como protótipos

Inicialmente os padrões de adesão das amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1) foram confirmados em ensaios com células HEp-2. Os testes foram realizados com os intervalos de incubação bactéria-células epiteliais de 3h e 6h. A Figura 2 apresenta os resultados desses ensaios. Conforme se observa, o padrão de adesão agregativa típica, demonstrando a presença de bactérias aderidas umas as outras em uma configuração semelhante a tijolos empilhados sobre as células e à superfície da lamínula, foi expresso por ambas as amostras de EAEC. Uma vez que esse padrão de adesão em células epiteliais cultivadas define a categoria EAEC (NATARO; KAPER, 1998), a confirmação da expressão desse fenótipo permitiu a continuação desse estudo utilizando essas amostras como protótipos de EAEC típica e atípica.

Figura 2 - Padrões de interação das amostras de EAEC 042 (típica) e 2871-1 (atípica) com células HEp-2. As células foram coradas com solução de May-Grünwald/Giemsa. A, padrão agregativo de adesão da amostra 042 em ensaio de 3h; B, padrão agregativo de adesão da amostra 042 em ensaio de 6h; C, controle negativo de adesão empregando a *E. coli* DH5α em ensaio de 3h; D, controle negativo de adesão empregando a *E. coli* DH5α em ensaio de 6h; E, padrão agregativo de adesão da amostra 2871-1 em ensaio de 3h; F, padrão agregativo de adesão da amostra 2871-1 em ensaio de 6h. Aumento de 1.000 vezes.

4.4 Caracterização genotípica das amostras de EAEC típica e atípica selecionadas como protótipos

A pesquisa de alguns marcadores de virulência de EAEC foi realizada na amostra de EAEC 2871-1 com o intuito de caracterizar essa amostra quanto à presença de marcadores de EAEC descritos após a publicação relatando o perfil genético desta amostra (ELIAS *et al.*, 2002).

Inicialmente foi confirmada a presença do gene *shf* em ambas as amostras protótipos 042 e 2871-1. Conforme se observa na Figura 3, houve amplificação do fragmento previsto de 613 pb, confirmando a presença de *shf* em ambas.

Figura 3 - Pesquisa da presença do gene *shf* nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1). Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos produtos amplificados nas PCR para detecção do gene *shf*, utilizando o par de iniciadores *shf* (F e R). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: marcador *1 kb ladder* (Invitrogen); Linha 2: amostra EAEC típica 042 (controle positivo); Linha 3: amostra *E. coli* DH5 α (controle negativo); Linha 4: amostra EAEC atípica 2871-1. A seta indica o fragmento de 613 pb correspondente ao fragmento amplificado na reação.

Após a confirmação da presença do gene *shf* nas duas amostras selecionadas, os seguintes marcadores de virulência de EAEC foram pesquisados na amostra 2871-1: *aaiA*, *pilS*, *agg3A*, *agg3C*, *virK* e *capU*.

A Figura 4 mostra a reação de amplificação do gene *agg3A*, o qual codifica a pilina da fímbria AAF/III de EAEC (BERNIER *et al.*, 2002). Pode-se observar a amplificação do fragmento de 462 pb referente a esse gene na amostra RNT785-1, usada como controle positivo. Nas amostras 042 e 2871-1, *agg3A* não foi detectado.

Figura 4 - Pesquisa da presença do gene *agg3A* nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1). Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos produtos amplificados nas PCR para detecção do gene *agg3A*, utilizando o par de iniciadores *agg3A* (F e R). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: marcador *1 kb ladder* (Invitrogen); Linha 2: amostra RNT785-1 (controle positivo); Linha 3: amostra EAEC típica 042; Linha 4: amostra EAEC atípica 2871-1; Linha 5: amostra *E. coli* DH5 α (controle negativo). A seta indica o fragmento de 462 pb correspondente ao fragmento amplificado na reação.

Em seguida, a presença do gene que codifica o *usher* da fímbria AAF/III (*agg3C*) foi avaliada nessas mesmas amostras. Conforme apresentado na Figura 5, houve amplificação do fragmento previsto de 485 pb, correspondente ao gene *agg3C* somente nas amostras A30 (controle positivo) e na 042, enquanto na amostra 2871-1 não houve a detecção desse gene.

Figura 5 - Pesquisa da presença do gene *agg3C* nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1). Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos produtos amplificados nas PCR para detecção do gene *agg3C*, utilizando o par de iniciadores *agg3C* (F e R). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: marcador *1 kb ladder* (Invitrogen); Linha 2: amostra A30 (controle positivo); Linha 3: amostra *E. coli* DH5 α (controle negativo); Linha 4: amostra EAEC atípica 2871-1; Linha 5: amostra EAEC típica 042. A seta indica o fragmento de 485 pb correspondente ao fragmento amplificado na reação.

A presença de um dos genes do operon *aai* (*AggR-activated island*), localizado em uma ilha de patogenicidade de 117 kb, denominada *pheU* PAI (DUDLEY *et al.*, 2006b) foi investigada nas amostra 2871-1. A Figura 6 mostra a detecção do gene *aaiA* de 476 pb na amostra 042, usada como controle positivo e a sua ausência na amostra 2871-1.

Figura 6 – Pesquisa da presença do gene *aaiA* nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1). Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos produtos amplificados nas PCR para detecção do gene *aaiA*, utilizando o par de iniciadores *aaiA* (F e R). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: marcador *1 kb ladder* (Invitrogen); Linha 2: amostra EAEC típica 042 (controle positivo); Linha 3: amostra EAEC atípica 2871-1; Linha 4: amostra *E. coli* DH5 α (controle negativo). A seta indica o fragmento de 476 pb correspondente ao fragmento amplificado na reação.

A presença do gene *pilS*, que codifica a pilina correspondente à subunidade principal do pili tipo IV descrita em uma amostra de EAEC atípica (DUDLEY *et al.*, 2006a), também foi pesquisada nas amostras protótipo deste estudo. A Figura 7 mostra as reações de amplificação do gene *pilS*. Observa-se que houve amplificação do fragmento previsto de 534 pb, somente na amostra C1096 (controle positivo), enquanto nas amostras 042 e 2871-1 não houve a detecção desse gene.

Figura 7 – Pesquisa da presença do gene *pilS* nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1). Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos produtos amplificados nas PCR para detecção do gene *pilS*, utilizando o par de iniciadores *pilS* (F e R). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: marcador *1 kb ladder* (Invitrogen); Linha 2: amostra C1096 (controle positivo); Linha 3: amostra EAEC típica 042; Linha 4: amostra EAEC atípica 2871-1; Linha 5: amostra *E. coli* DH5 α (controle negativo). A seta indica o fragmento de 534 pb correspondente ao fragmento amplificado na reação.

O gene plasmidial *shf* foi descrito no plasmídeo pAA2 da amostra 042 onde faz parte de um grupo de genes denominado *cap cluster*, juntamente com os genes *virK* e *capU* (FUJIYAMA *et al.*, 2008). Esses dois genes também foram pesquisados nas amostras deste estudo com o intuito de verificar se o gene *shf* detectado na amostra 2871-1 estava ou não presente com o *cap cluster*.

A Figura 8 mostra a amplificação de um fragmento de 951 pb correspondente ao gene *virK* em ambas as amostras protótipos deste estudo.

Figura 8 – Pesquisa da presença do gene *virK* nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1). Eletroforese em gel de agarose (0,7%) dos produtos amplificados nas PCR para detecção do gene *virK*, utilizando o par de iniciadores *virK* (F e R). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: marcador *1 kb ladder* (Invitrogen); Linha 2: amostra *E. coli* DH5 α (controle negativo); Linha 3: amostra EAEC típica 042 (controle positivo); Linha 4: amostra EAEC atípica 2871-1; A seta indica o fragmento de 951 pb correspondente ao fragmento amplificado na reação.

Na Figura 9 estão apresentadas as reações de amplificação do gene *capU*, onde se observa a amplificação de um fragmento de 822 pb correspondente a esse gene *capU* nas amostras 042 e 2871-1.

Figura 9 – Pesquisa da presença do gene *capU* nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1). Eletroforese em gel de agarose (0,7%) dos produtos amplificados nas PCR para detecção do gene *capU*, utilizando o par de iniciadores *capU* (F e R). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: marcador *1 kb ladder* (Invitrogen); Linha 2: amostra EAEC típica 042 (controle positivo); Linha 3: amostra EAEC atípica 2871-1; Linha 4: amostra *E. coli* DH5α (controle negativo); A seta indica o fragmento de 822 pb correspondente ao fragmento amplificado na reação.

Em resumo, a presença do gene *shf* foi confirmada nas amostras de EAEC típica (042) e atípica (2871-1) selecionadas como protótipos para este estudo. Com relação à amostra 2871-1, foi verificada a presença do *cap cluster*, ou seja, o gene *shf* está acompanhado dos genes *virK* e *capU* de forma semelhante à amostra 042. Além desses três genes, a amostra 2871-1 é desprovida de todos os marcadores de virulência associados com EAEC, inclusive o gene que codifica o regulador global dos genes de virulência de EAEC (*aggR*).

4.5 Determinação do papel da proteína Shf na adesão agregativa e na capacidade de formação de biofilme de EAEC típica e atípica

4.5.1. Mutagênese de *shf* nas amostras 042 e 2871-1

Para realização dos experimentos de mutagênese em *shf* na amostra 2871-1 foi necessário selecionar um mutante espontâneo ao ácido nalidíxico, uma vez que ela não apresentou resistência aos antimicrobianos disponíveis comercialmente (dados não apresentados). Após a seleção do mutante 2871-1/Nal o mesmo foi analisado quanto à capacidade de crescimento em caldo TSB a fim de verificar se em decorrência da mutação não havia ocorrido alguma alteração na sua curva de crescimento.

A curva de crescimento da amostra mutante 2871-1/Nal em comparação com a amostra selvagem está apresentada na Figura 10, onde se observa que as duas curvas de crescimento foram similares.

Em seguida, a amostra 2871-1/Nal também foi avaliada no teste de adesão em células HEp-2, onde apresentou o mesmo padrão agregativo em comparação à amostra selvagem (Figura 15). Esses dados indicam que o mutante resistente ao ácido nalidíxico manteve as características de multiplicação e de adesão *in vitro*, permitindo o prosseguimento dos experimentos de mutação em *shf*.

Figura 10 - Curva de crescimento da amostra 2871-1 selvagem e mutante resistente ao ácido nalidíxico (2871-1/Nal). As amostras foram cultivadas em caldo TSB sob agitação constante de 300 rpm a 37 °C. As absorbâncias dos cultivos das amostras 2871-1 (—◆—) e 2871-1/Nal (—■—) em comprimento de onda de 600 nm foram obtidas em intervalos de 30 min durante 8h.

A etapa inicial da mutagênese em *shf* incluiu a clonagem de uma seqüência interna desse gene no vetor pGEM-T Easy, seguida da retirada desse inserto com uma enzima de restrição e posterior subclonagem no vetor pJP5603, para inativação do gene *shf* nas amostras selvagens através de recombinação homologa.

O fragmento interno do gene *shf* de 613 pb foi amplificado a partir da amostra 042, purificado e quantificado através de eletroforese em gel de agarose. Observa-se na Figura 11 o fragmento *shf* purificado na concentração de ~100 ng/μl.

Figura 11 – Purificação do fragmento *shf* amplificado por PCR. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto amplificado na reação de PCR para o gene *shf*, utilizando os iniciadores *shf* (F e R) e o DNA da amostra 042. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: *Ladder Low Mass* (Invitrogen); Linha 2: fragmento *shf* amplificado por PCR após purificação. A seta indica o fragmento de 613 pb.

Em seguida, esse fragmento foi ligado ao vetor pGEM-T Easy e essa ligação foi eletroporada em *E. coli* JM109. Os transformantes resultantes foram selecionados em placa de ágar LB contendo IPTG, X-Gal e ampicilina. Dez colônias brancas que cresceram nesse meio foram escolhidas para a confirmação da clonagem do inserto através de uma PCR para detecção do gene *shf*. Uma das colônias que apresentou amplificação do fragmento esperado (613 pb) foi selecionada para cultivo e extração do DNA plasmidial para análise através de digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. O sítio de restrição para essa enzima está localizado no sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM-T Easy e a sequência do gene *shf* da amostra 042 não apresenta sítios de restrição para essa enzima. Dessa forma, a digestão do plasmídeo recombinante com *EcoRI* liberou o inserto *shf* do vetor (Figura 12), confirmando a sua correta clonagem. Esse plasmídeo foi denominado pFV2.

Figura 12 – Análise do perfil de restrição do plasmídeo pFV2. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA plasmidial extraído da amostra JM109(pFV2) antes e após a digestão com a enzima *EcoRI*. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: marcador *1 kb ladder* (Invitrogen); Linha 2: plasmídeo pFV2 não digerido; Linha 3: plasmídeo pFV2 digerido com a enzima *EcoRI*; Linha 4: inserto *shf* purificado utilizado na clonagem. As setas indicam o inserto *shf* (613 pb) e o vetor pGEM-T Easy linearizado (3 kb).

Após a obtenção do clone pFV2 contendo uma seqüência interna do *shf* clonado, o fragmento foi liberado através da digestão do pFV2 com *EcoRI*. Essa purificação foi analisada e quantificada através de eletroforese em gel de agarose. Observa-se na Figura 13 o fragmento *shf* purificado na concentração de ~20 ng/μl.

Figura 13 – Purificação do fragmento *shf* clonado no plasmídeo pFV2. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do produto de 613 pb da digestão do plasmídeo pFV2 com a enzima *EcoRI*. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: *Ladder Low Mass* (Invitrogen); Linha 2: inserto do plasmídeo pFV2 após digestão com *EcoRI* e purificação. A seta indica o fragmento de 613 pb.

Para a subclonagem desse fragmento *shf* (contendo os sítios para *EcoRI* em suas extremidades) no vetor pJP5603, procedeu-se à extração e purificação desse plasmídeo, seguida de sua digestão com a enzima *EcoRI* e posterior ligação ao inserto *shf*. Essa ligação foi eletroporada em *E. coli* DH5 α pir e os transformantes foram selecionados em placa de ágar LB contendo canamicina. Dez colônias que cresceram nesse meio foram escolhidas para a confirmação da clonagem do inserto através de uma PCR para detecção do gene *shf*. Uma das colônias que apresentou amplificação do fragmento esperado de 613 pb (Figura 14) foi selecionada para cultivo e extração do DNA plasmidial para análise através de digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. A digestão do plasmídeo recombinante com *EcoRI* liberou o inserto *shf* do vetor, confirmando a sua correta clonagem. Esse plasmídeo foi denominado pFV3.

Figura 14 – Confirmação da presença do fragmento *shf* no plasmídeo pFV3 através de PCR. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do produto amplificado na reação de PCR para o gene *shf*, utilizando os iniciadores *shf* (F e R) e o DNA da amostra DH5α*pir*(pFV3). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1: *Ladder Low Mass* (Invitrogen); Linha 2: amostra EAEC típica 042 (controle positivo); Linha 3: amostra *E. coli* DH5α (controle negativo); Linha 4: amostra DH5α*pir* (pFV3). A seta indica o fragmento de 613 pb.

Após a clonagem do fragmento interno do gene *shf* no vetor suicida pJP5603, foi realizada a recombinação homóloga entre o plasmídeo pFV3 e o gene *shf* das amostras selvagens de EAEC 042 e 2871-1/Nal. Esse evento foi realizado através de conjugações entre a amostra doadora DH5α*pir* (pFV3) e as receptoras 042 e 2871-1/Nal.

Foram selecionados dez transconjugantes de cada conjugação denominados TC042 de 1 a 10 (resultantes da conjugação com a 042) e TC2871 de 1 a 10 (resultantes da conjugação com a 2871-1/Nal). As vinte colônias foram então semeadas em ágar MacConkey, em caldo LB com os respectivos antibióticos de seleção, e avaliadas por testes bioquímicos para identificação de espécie. Após as confirmações da capacidade de fermentação da lactose, da determinação bioquímica da espécie *E. coli* e das resistências aos respectivos antibióticos, esses transconjugantes foram avaliados quanto à

correta inativação do gene *shf*. Para isso foi realizada uma PCR utilizando os iniciadores *shf_{cloning}*(F e R), o qual amplifica um fragmento de 843 pb com base na sequência de nucleotídeos do gene *shf* da amostra 042 depositada no GenBank. Não houve amplificação de nenhum fragmento nos dez transconjugantes de ambas as amostras. Dessa forma os transconjugantes TC042-1 e TC287-1 foram selecionados para posteriores análises e essas amostras foram denominados 042::pFV3 e 2871/Nal::pFV3, respectivamente.

4.5.2 Análise fenotípica dos mutantes *shf*⁻

Para analisar o efeito da mutação em *shf* nos fenótipos de adesão agregativa e de formação de biofilme, os mutantes 042::pFV3 e 2871/Nal::pFV3 foram analisados nos ensaios de adesão em células HEp-2 e de formação de biofilme em placas de poliestireno.

A Figura 15 mostra o resultado dos ensaios de adesão das amostras 042 e 2871-1/Nal em comparação com os seus respectivos mutantes *shf*⁻. Observa-se a completa perda da capacidade de adesão nas duas amostras mutantes (042::pFV3 e 2871/Nal::pFV3). Esses resultados demonstram que a mutação em *shf* destituiu a capacidade de adesão tanto em EAEC típica como em atípica.

Figura 15- Padrão de interação das amostras de EAEC 042 (típica), 2871-1 (atípica) e de seus respectivos mutantes 042::pFV3 e 2871-1/Nal::pFV3 com células epiteliais HEp-2. As células foram coradas com solução de May-Grünwald/Giemsa. A, padrão agregativo de adesão da amostra 042 em ensaio de 3h; B, ausência de adesão da amostra mutante 042::pFV3 em ensaio de 3h; C, adesão agregativa da amostra 2871-1 em ensaio de 6h; D, ausência de adesão da amostra mutante 2871-1::pFV3 em ensaio de 6h. Aumento de 1.000 vezes.

Em seguida, as amostras mutantes foram avaliadas quanto à capacidade de formar biofilme em superfície de poliestireno. A Figura 16 mostra o gráfico das absorvâncias obtidas das amostras selvagens e seus respectivos mutantes. Conforme se observa, a mutação em *shf* provocou uma redução acentuada na capacidade de formar biofilme nas duas amostras de EAEC típica e atípica. As absorvâncias de ambas as amostras mutantes foram semelhantes à determinada para a amostra utilizada como controle negativo no ensaio (*E. coli* DH5α).

Figura 16 – Capacidade de formação de biofilme em poliestireno apresentada pelas amostras de EAEC típica (042), atípica (2871-1) e de seus respectivos mutantes 042::pFV3 e 2871-1/Nal::pFV3. Gráfico das absorbâncias em comprimento de onda de 595 nm das suspensões de cristal violeta em etanol 95%, correspondentes às colorações dos biofilmes formados nas placas de poliestireno após de incubação das bactérias em meio DMEM com 0,4% de glicose a 37 °C em condições estáticas por 24h. A amostra *E. coli* DH5α foi utilizada como controle negativo.

5 DISCUSSÃO

Cerca de dois milhões de mortes devido à doença diarréica ocorrem no mundo anualmente (PETRI *et al.*, 2008). A maior parte dos casos ocorre em crianças menores de cinco anos, faixa etária onde a diarréia aguda ainda é a segunda causa de mortalidade (JAFARI *et al.*, 2009).

Os patótipos de ECD destacam-se como os agentes etiológicos bacterianos mais prevalentes das doenças diarréicas (CLARKE, 2001). Dentre esses patótipos está a EAEC, considerado um patógeno entérico emergente (BUERIS *et al.*, 2007; FLORES; OKHUYSEN, 2009; HUANG *et al.*, 2006; MORENO *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2005; REGUA-MANGIA *et al.*, 2004; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2002; SARANTUYA *et al.*, 2004; SCALETISKY *et al.*, 2002b; SVENUNGSSON *et al.*, 2000).

Inúmeros estudos epidemiológicos sobre a etiologia da diarréia aguda e persistente na infância apontam EAEC como o patótipo de ECD mais prevalente (FLORES; OKHUYSEN, 2009; HUANG *et al.*, 2006). De fato, Huang *et al.* (2006) demonstraram que EAEC está estatisticamente associada como agente de diarréia aguda e persistente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, diarréia em pacientes com HIV, diarréia do viajante e surtos de diarréia em países desenvolvidos, através de uma meta-análise de todos artigos sobre o isolamento de EAEC publicados entre 1987 e 2006.

Vários potenciais fatores de virulência foram descritos em EAEC, mas a patogênese da diarréia causada por esse patótipo ainda não foi totalmente esclarecida (KAPER *et al.*, 2004). A maioria desses fatores de virulência foi descrita na amostra protótipo 042, embora alguns deles tais como as adesinas AAF/I, AAF/III, pili tipo IV, Hda e Ap58, tenham sido identificados em outras amostras de EAEC (BOISEN *et al.*, 2008; BERNIER *et al.*, 2002; DUDLEY *et al.*, 2006a; MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003; NATARO *et al.*, 1992). Além disso, os fatores envolvidos com alguns mecanismos de virulência apresentados por algumas amostras de EAEC, tais como a invasão e a indução da secreção de muco e interleucinas, não são completamente conhecidos (FLORES; OKHUYSEN, 2009; STEINER *et al.*, 1998; WEINTRAUB, 2007).

Alguns dos genes que codificam potenciais fatores de virulência de EAEC estão localizados em plasmídeos de alto peso molecular (~100 kb),

geralmente presentes em amostras desse patótipo (KAPER *et al.*, 2004). Devido à associação desses plasmídeos com a expressão do padrão AA, eles foram denominados pAA (HARRINGTON *et al.*, 2006).

Dentre as amostras de EAEC descritas na literatura, certamente a 042 é a mais conhecida e estudada. Ela foi isolada de uma criança com diarreia aguda em Lima (Peru), pertence ao sorotipo O44:H18 e foi a única cepa capaz de causar diarreia em voluntários humanos (NATARO *et al.*, 1995; VIAL *et al.*, 1988). Esse fato direcionou a essa amostra a maioria dos estudos sobre virulência de EAEC realizados na última década. O plasmídeo pAA2, bem como o genoma da 042 foram completamente seqüenciados (CZECZULIN *et al.*, 1999; RASKO *et al.*, 2008).

Alguns dos genes que codificam os potenciais fatores de virulência descritos na amostra protótipo 042 estão localizados no pAA2 e outros no cromossomo. Os genes encontrados no pAA2 são: *aafABCD* e *aggR* (codificam as proteínas envolvidas na biogênese da fímbria AAF/II), *aatPABCD* (codificam as proteínas envolvidas no sistema de secreção do tipo ABC), *aap* (codifica a proteína antiagregativa Dispersina), *astA* (codifica a toxina EAST) e *pet* (codifica a toxina Pet) (ELIAS *et al.*, 1999; CZECZULIN *et al.*, 1999; SHEIKH *et al.*, 2002; NISHI *et al.*, 2005).

Além dos genes descritos anteriormente, o seqüenciamento do plasmídeo de virulência pAA2 revelou um grupo de três genes (*shf*, *capU* e *virK*) entre o operon *aatPABCD* e o gene *aafC*, denominado *cap cluster* (CZECZULIN *et al.*, 1999). A proteína codificada por *capU* apresenta identidade com o produto de um gene relacionado a biossíntese do lipopolissacarídeo de *E. coli* O157:H7 (CZECZULIN *et al.*, 1999), enquanto *virK* parece estar relacionado à regulação pós-transcricional de *virG* em *Shigella flexneri* (NAKATA *et al.*, 1992). Por outro lado, Czeczulin *et al.* (1999) reportaram que o plasmídeo pAA2 não alberga o gene *virG*. Já o gene *shf* codifica uma proteína que apresenta homologia com IcaB de *S. epidermidis*, a qual participa da modificação da molécula de exopolissacarídeo envolvida na formação de biofilme e adesão intercelular (HEILMANN *et al.*, 1996). O papel das proteínas codificadas por *capU*, *virK* e *shf* na patogênese de EAEC não é conhecido.

Recentemente foi proposta uma subclassificação de EAEC nos grupos típica e atípica, com base na presença ou ausência do gene *aggR*, respectivamente (SARANTUYA *et al.*, 2004). O gene *aggR* codifica uma proteína da família AraC de ativadores transcricionais e corresponde a um ativador global dos genes de virulência de EAEC (NATARO *et al.*, 1994; HARRINGTON *et al.*, 2006). Pelo menos os operons *aaf* e *aai* e os genes *aap*, *aatA* e *pet* são regulados por AggR, e o conjunto desses genes é conhecido como regulon AggR (HARRINGTON *et al.*, 2006). Uma vez que a detecção de *aggR* está associada à presença dos plasmídeos pAA e, conseqüentemente, de vários potenciais fatores de virulência, foi sugerido que o subgrupo de EAEC típica apresente maior potencial de virulência (HARRINGTON *et al.*, 2006; SARANTUYA *et al.*, 2004)

O patótipo EAEC é muito heterogêneo com relação à prevalência dos diversos genes que codificam os marcadores de virulência, ou seja, nenhum gene ou grupo de genes de virulência está presente em todas as amostras de EAEC (HUANG *et al.*, 2006). Isso indica que apenas um grupo de amostras de EAEC seja patogênico para o homem, porém as características desse grupo ainda não foram definidas.

Nos estudos em que a distribuição dos genes de virulência de EAEC foi pesquisada, *shf* aparece dentre os mais prevalentes (BOUZARI *et al.*, 2005; CZECZULIN *et al.*, 1999; ELIAS *et al.*, 2002; JENKINS *et al.*, 2006a; KAHALI *et al.*, 2004; MOHAMED *et al.*, 2007; REGUA-MANGIA *et al.*, 2009; SUZART *et al.*, 2001; ZAMBONI *et al.*, 2004)

Embora esse gene seja detectado com freqüência em amostras de EAEC, a função da proteína Shf na patogênese não foi estabelecida. A homologia com a proteína IcaB de *S. epidermidis* (HEILMANN *et al.*, 1996) sugere uma participação de Shf na formação de biofilme de EAEC, fenótipo descrito como multifatorial nesse patótipo (SHEIKH *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003; FUJIYAMA *et al.*, 2008).

Desta forma, os principais objetivos deste estudo foram determinar a prevalência de *shf* em amostras de EAEC típicas e atípicas isoladas em nosso meio, caracterizar essas amostras e avaliar a eventual participação de Shf no estabelecimento dos fenótipos de adesão agregativa e de formação de biofilme em EAEC típica e atípica.

Com o intuito de verificar a prevalência do gene *shf* em amostras isoladas em nosso meio, foram selecionadas as 113 amostras de EAEC isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda na infância, realizado na cidade de Salvador (BA) durante os anos de 2003 e 2004. Nesse estudo, EAEC foi o enteropatógeno bacteriano mais prevalente e esteve estatisticamente associado à diarreia. Essas amostras foram identificadas com base na detecção do gene *aatA*, correspondente à sonda CVD432 ou sonda AA, e não pelo padrão AA em células epiteliais cultivadas (BUERIS *et al.*, 2007).

No presente estudo, o gene *shf* foi detectado em 41 (39%) amostras de EAEC isoladas em Salvador, desconsiderando a classificação dessas amostras nos subgrupos típica e atípica. Essa prevalência está de acordo com relatos anteriores sobre essa prevalência em EAEC sem classificação em típica ou atípica, onde foram mostradas altas prevalências do gene *shf*, com valores variando entre 17,6% e 65,3% (BOUZARI *et al.*, 2005; CZECHULIN *et al.*, 1999; ELIAS *et al.*, 2002; JENKINS *et al.*, 2006a; KAHALI *et al.*, 2004; REGUA-MANGIA *et al.*, 2009; ZAMBONI *et al.*, 2004). Czechulin *et al.* (1999) reportaram que a incidência do gene *shf* entre amostras de EAEC isoladas de diversos países foi de 50%. Em outro estudo realizado por Kahali *et al.* (2004) na Índia, *shf* também foi detectado em alta prevalência (65,3%). Esses dados demonstram que *shf* é um dos marcadores frequentemente detectados em EAEC, embora a sua incidência seja menor que a de *aggR* e a da sonda CVD432 (*aatA*) (CZECHULIN *et al.*, 1999; ELIAS *et al.*, 2002; JENKINS *et al.*, 2006a; KAHALI *et al.*, 2004; REGUA-MANGIA *et al.*, 2009; ZAMBONI *et al.*, 2004).

Nos estudos realizados no Brasil, a prevalência do gene varia entre 27,9% e 49,4% (Elias *et al.*, 2002; REGUA-MANGIA *et al.*, 2009; ZAMBONI *et al.*, 2004). Entretanto em um estudo realizado em Londrina (PR) esse gene não foi detectado nas amostras de EAEC selecionadas através do padrão AA em células HEp-2 (GIOPPO *et al.*, 2000).

Embora prevalente em EAEC, *shf* também foi detectado em amostras de EHEC (CZECHULIN *et al.*, 1999), EPEC atípica (GOMES *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2008), *E. coli* uropatogênicas (ABE *et al.*, 2008) e em amostras classificadas como não pertencentes ao patótipo EAEC (JENKINS *et*

al., 2006a). Em amostras de EPEC atípicas do sorotipo O51:H40, *shf* foi o único marcador de virulência detectado em amostras capazes de causar a lesão A/E em alça ligada de coelho (MOREIRA *et al.*, 2008). Além disso, Moreira (2001) demonstrou que o gene *shf* era o único marcador de virulência em EAEC do sorotipo O128:H35 e que esse gene estava localizado no cromossomo dessas amostras e não em plasmídeos. O conjunto desses dados indicam que *shf* pode ser transferido entre amostras de diferentes patótipos e que essa transferência pode ocorrer entre plasmídeo e cromossomo através de eventos de transposição.

Uma vez determinada a prevalência de *shf* em EAEC, as amostras portadoras desse gene foram avaliadas com relação aos seus sorogrupos. Foram determinados 21 distintos sorogrupos dentre as 41 amostras, sendo que nenhum deles prevaleceu e em nove amostras o antígeno O não foi tipado. A grande diversidade de sorogrupos ou sorotipos em amostras de EAEC é uma característica amplamente demonstrada (CZECZULIN *et al.*, 1999; JENKINS *et al.*, 2006a; KAHALI *et al.*, 2004; REGUA-MANGIA *et al.*, 2009; PIVA *et al.*, 2003; UBER *et al.*, 2006; VIAL *et al.*, 1988; ZAMBONI *et al.*, 2004) e essa característica se manteve dentre as amostras *shf*⁺ deste estudo.

Essas mesmas amostras *shf*⁺ foram também analisadas quanto aos padrões de adesão em células HEp-2. Uma vez que todas foram previamente classificadas como EAEC, devido à reatividade com a sonda CVD432 (BUERIS *et al.*, 2007), era esperado que todas apresentassem o padrão AA característico de EAEC. De fato, a maioria delas (78,1%) apresentou o padrão AA nos ensaios de adesão de 6h. O restante das amostras apresentou o padrão AD (7,3%) ou foram incapazes de aderir (14,6%) em células HEp-2. Amostras reativas com a sonda CVD432 incapazes de aderir em células epiteliais cultivadas foram descritas por outros autores (GIOPPO *et al.*, 2000). Essa incapacidade de aderir em células HEp-2 pode refletir a perda do fator que medeia essa adesão após o isolamento da amostra ou mesmo a falta de receptores para as adesinas na linhagem HEp-2, que não é de origem intestinal (NATARO; KAPER, 1998). Com relação às amostras que apresentaram o padrão DA, não há relatos na literatura sobre amostras de DAEC que hibridizem com a sonda CVD432. No entanto, há relatos mostrando que a sonda *daaC* empregada para o diagnóstico molecular de DAEC pode

detectar amostras de EAEC em decorrência de reação cruzada entre o *usher* da fímbria F1845 (*daaC*) e outros *ushers* de fímbrias que medeiam o padrão AA (NATARO; KAPER, 1998).

As 41 amostras de EAEC em que *shf* foi detectado foram classificadas nos subgrupos de típica e atípica pela detecção do gene *aggR* (SARANTUYA *et al.*, 2001). Dentre as 113 EAEC avaliadas 67 foram classificadas como típicas e 46 como atípicas. Dessa forma, o gene *shf* foi encontrado em 37,3% das amostras de EAEC típicas e em 34,8% das EAEC atípicas. Isso demonstrou que *shf* esteve distribuído em porcentagens semelhantes em ambos os grupos. Não há relatos na literatura demonstrando a prevalência de *shf* em amostras previamente classificadas como EAEC típicas ou atípicas. Todavia, ao analisar os resultados publicados sobre a detecção de *shf* foi possível separar as amostras *shf*⁺ típicas e atípicas nos estudos em que a detecção de *aggR* foi relatada. Na maioria desses trabalhos as prevalências de *shf* nos dois grupos foram bastante semelhantes, variando entre 16% e 55,2% (CZECZULIN *et al.*, 1999; REGUA-MANGIA *et al.*, 2009; ZAMBONI *et al.*, 2004). Essa distribuição semelhante não foi encontrada por Elias *et al.* (2002) onde *shf* foi detectado em 52,8% das EAEC *aggR*⁺ e em 16% das *aggR*⁻. Entretanto a amostragem de EAEC *aggR* analisada nesse estudo foi pequena, incluindo somente 12 amostras.

O fato de amostras de EAEC atípica albergarem *shf* em alta prevalência indica que esse gene não está sob a regulação de *AggR*, considerando que realmente ocorre a sua expressão nessas amostras.

As 41 amostras de EAEC *shf*⁺, também foram pesquisadas quanto à capacidade de formação de biofilme em superfície de poliestireno. A análise empregada demonstrou que todas foram capazes de formar biofilme. Oito amostras formaram biofilme menos densos, ou seja, com absorbância abaixo de 1,0 (quatro delas típicas e quatro atípicas). Outras quatro amostras foram capazes de formar biofilme muito densos, acima do valor de absorbância da amostra protótipo 042, sendo que uma delas era atípica. Isso demonstra que a capacidade de formar biofilme foi independente da presença ou ausência de *aggR*, ou seja, independente da caracterização em típica ou atípica. Isso difere de alguns relatos da literatura, onde *aggR* foi descrito como envolvido na formação de biofilme em EAEC (MOHAMED *et al.*, 2007; WAKIMOTO *et al.*,

2004). Devido à característica multifatorial da formação de biofilme em EAEC, a presença de outros genes associados a esse fenótipo, tais como *fis*, *yafK*, *aafA* e *fimA* (SHEIKH *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003), precisa ser pesquisada nas amostras do presente estudo para melhor compreensão da capacidade de formação de biofilme.

Outro aspecto bastante interessante é o fato de que amostras não aderentes tenham sido capazes de formar biofilme, uma vez que o primeiro passo para a sua formação em EAEC seria a adesão no padrão agregativo. Entre as 41 amostras *shf*^r, seis foram incapazes de aderir e três aderiram no padrão difuso em células HEp-2. No ensaio de formação de biofilme, essas nove amostras foram capazes de formar biofilme. No entanto, dentre as amostras capazes de formar biofilmes mais densos, todas foram apresentaram o padrão AA. Uma possível explicação para o fato de amostras não aderentes formarem biofilme em poliestireno seria o fato da presença de manose no ensaio de adesão, enquanto nos ensaios de biofilme a manose não é utilizada. Sabe-se que a fímbria tipo 1 é inibida pela manose e, portanto, uma amostra não aderente poderia ser capaz de formar biofilme com a participação dessa fímbria (CONNELL *et al.*, 1996; JOHNSON, 1991; MOREIRA *et al.*, 2003). Dessa forma, a análise da interação dessas amostras com células HEp-2 na ausência de manose merece ser investigada.

A fímbria do tipo I é a adesina mais comum encontrada em enterobactérias, e é usualmente observada em *E. coli* patogênicas e comensais, sendo sensível a resíduos de manose (CONNELL *et al.*, 1996). Essa fímbria codificada pelo operon *fim* é relatada como responsável pelo estabelecimento inicial da adesão em amostras de *E. coli* K12 e importante fator de virulência em *E. coli* uropatogênica (CONNELL *et al.*, 1996; JOHNSON, 1991). Amostras de EAEC mutantes em *fimD*, gene que codifica o *usher* da fímbria tipo I, apresentaram uma inibição no padrão AA de 80% e na formação de biofilme de 49%, demonstrando a importância dessa fímbria no estabelecimento desses fenótipos (MOREIRA *et al.*, 2003).

A segunda etapa do presente estudo consistiu na obtenção de mutantes em *shf* em uma amostra de cada subgrupo de EAEC, ou seja, em uma amostra típica e em uma atípica. Para isso foram selecionadas como protótipo as amostras 042 (típica) e 2871-1 (atípica).

A amostra 2871-1 foi isolada na cidade de São Paulo de um caso de diarreia aguda em uma criança e pertence ao sorotipo O4:H33 (GOMES *et al.*, 1998; UBER *et al.*, 2006). Essa amostra foi descrita como portadora apenas do gene *shf* (ELIAS *et al.*, 2002). Após essa caracterização genética, outros novos fatores de virulência de EAEC foram descritos e por esse motivo a presença desses fatores foi avaliada no presente estudo. Foram pesquisados os genes da biogênese da fímbria AAF/III (*aag3A* e *agg3C*), da principal subunidade do pili do tipo IV de EAEC (*pilS*), do operon *aai* da ilha de patogenicidade de EAEC (*aaiA*) e dos outros dois genes do *cap cluster* (*virK* e *capU*) (BERNIER *et al.*, 2002; CZECHULIN *et al.*, 1999). A complementação dessa análise mostrou que essa amostra apresenta também os genes *capU* e *virK*, ou seja, o *cap cluster* está presente nessa amostra. Como essa amostra é desprovida de *aggR*, isso a caracteriza como uma EAEC atípica que alberga apenas o *cap cluster*, dentre os fatores de virulência de EAEC descritos até o presente momento.

Cabe salientar o fato de que a amostra 2871-1, desprovida de quase todos marcadores de virulência descritos em EAEC, apresenta o *cap cluster* íntegro. Isso sugere que esses três genes sejam transferidos em conjunto, embora não haja evidências de que correspondam a um operon. Além disso, os genes *capU* e *virK* não foram considerados diretamente envolvidos na formação de biofilme da amostra 042 (FUJIYAMA *et al.*, 2008).

A mutagênese realizada nas duas amostras selecionadas foi do tipo não-polar, ou seja, a transcrição dos genes *capU* e *virK*, localizados à jusante de *shf*, não foi afetada. O efeito da mutação em *shf* nessas duas amostras foi avaliado nos fenótipos de adesão à células epiteliais e de formação de biofilme em poliestireno.

O ensaio de adesão em células HEp-2 mostrou uma inibição total da adesão de ambas as amostras mutantes, tanto em 3h como em 6h de interação bactérias-células epiteliais. Embora EAEC possua várias adesinas responsáveis pela adesão a células epiteliais, esses dados sugerem que o produto de *shf* tenha um papel importante na interação celular desse patótipo. Esse achado é interessante considerando-se que a amostra 042 expressa a fímbria AAF/II, descrita como responsável pelo seu padrão AA (CZECHULIN *et al.*, 1997), ao passo que a amostra 2871-1 não apresenta os genes das

fímbrias AAF/I, II e III., De forma não estabelecida, a proteína Shf participa de alguma etapa no processo de adesão e a sua ausência interfere com o processo de interação de AAF/II com as células epiteliais na amostra típica. Na amostra atípica a presença de uma adesina não conhecida não pode ser descartada e Shf poderia interagir de alguma forma também com essa adesina. A participação de Shf poderia estar também relacionada à síntese de exopolissacarídeos importantes na formação de biofilme em ambos subgrupos de EAEC.

Os achados relatados no presente estudo com relação à mutação em *shf* da amostra 042 se confrontam com os dados obtidos por Fujiyama *et al.* (2008), onde a mutação não causou significativa modificação no padrão de adesão entre a amostra selvagem e a mutante. Contudo, esses autores não apresentaram uma figura mostrando o padrão de adesão da amostra mutante. Embora em desacordo com os dados obtidos por esses autores, os resultados relatados no presente estudo foram confirmados em diferentes ensaios realizados sempre em triplicatas.

Cabe aqui salientar, que o presente projeto de pesquisa foi iniciado em 2005, anteriormente à publicação do artigo de Fujiyama *et al.* (2008), que relatou o nocaute no *cap cluster* da amostra 042. Os objetivos apresentados em nosso estudo eram originais no momento de sua elaboração e a análise da mutação em *shf* em uma EAEC atípica não ainda foi descrita na literatura.

Após a verificação do efeito do nocaute em *shf* na adesão em células epiteliais, foi analisado o efeito dessa mutação na capacidade de formação de biofilme. Novamente foi constatada uma significativa diminuição da capacidade de formação de biofilme nessas amostras mutantes em relação às amostras selvagens.

A capacidade de EAEC em formar biofilme *in vivo* foi descrita em cultura de biópsia de cólon humano e sugere uma relação com a persistência da diarreia (HICKS *et al.*, 1996; SHEIKH *et al.*, 2001). A participação da fímbria AAF/II e das proteínas Fis e YafK na formação desse biofilme de EAEC foi descrita por Sheikh *et al.* (2001), utilizando a amostra protótipo 042 cultivada em meio de cultura celular rico em glicose. A proteína Fis está envolvida na transcrição dependente da fase de crescimento e YafK é uma proteína hipotética necessária para a expressão de AAF/II (SHEIKH *et al.*,

2001). Nenhum dos mutantes que perderam a capacidade de formar biofilme apresentou inserção em *shf* no estudo de Sheikh *et al.* (2001). Além de Fis e YafK, o envolvimento da fímbria tipo I no fenótipo de formação de biofilme em EAEC foi evidenciado por Moreira *et al.* (2003).

Tomando por base a função de IcaB em *S. epidermidis*, a única proteína que apresenta homologia com Shf, pode-se sugerir seu papel na formação de exopolissacarídeos, fundamentais para o estabelecimento de biofilmes e conseqüentemente para a adesão agregativa de EAEC (CZECZULIN *et al.*, 1999; HEILMANN *et al.*, 1996; VUONG *et al.*, 2004).

A produção de uma mistura extracelular de polímeros de açúcar denominados exopolissacarídeos é crítica para a formação de biofilmes bacterianos, sendo o principal componente da sua matriz (WATNICK, KOLTER, 2000). Estudos demonstraram que a proteína IcaB é responsável pela desacetilação da molécula poli-N-acetilglucosamina, formando uma molécula exopolissacarídica presente em muitos microrganismos, e que participa da formação do biofilme (VUONG *et al.*, 2004).

A produção de polímeros de açúcar que irão formar a camada de exopolissacarídeo, a qual é característica e crítica para a formação do biofilme, possui função importante na capacidade de evasão do sistema imune e à tolerância a agentes antibacterianos (HEILMANN *et al.*, 1996; VUONG *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, pôde-se observar que as amostras típica e atípica mutadas no gene *shf*, apresentaram uma baixa capacidade de formação de biofilme, porém também houve a inibição da sua capacidade de adesão em células HEp-2.

Fujiyama *et al.* (2008) analisaram a função do *cap cluster* na amostra de EAEC 042 através do nocaute desses genes e avaliaram, através de ensaio de agregação em meio líquido e em células HEp-2, e de formação de biofilme, os efeitos desses nocautes. Todos os mutantes mantiveram a capacidade de agregar, porém o mutante do gene *shf* foi o único que sofreu uma diminuição significativa na capacidade de formação de biofilme. Além disso, esses autores descreveram que *shf* está sob o controle transcricional de AggR. Esses autores sugerem que *shf* não está relacionado à agregação na fase líquida do biofilme e na sua adesão na fase inicial, mas que pode ter uma

função na adesão intercelular na fase de maturação do biofilme, de uma maneira similar ao que ocorre com IcaB.

Um dado interessante é o fato da amostra 2871-1, EAEC atípica que apresenta apenas o *cap cluster*, apresentar resultados bastante semelhantes ao da amostra 042 que apresenta um repertório genético de fatores de virulência bastante distinto. Tanto o mutante da amostra 042 quanto da 2871-1 apresentaram total redução da adesão e da capacidade de formação de biofilme. Isso indica que a expressão do gene *shf* na amostra 2871-1 não está sob o controle do gene *aggR*, regulador global dos genes de virulência de EAEC. Esses dados divergem dos resultados obtidos por Fujiyama *et al.* (2008), mostrando que o gene *shf* está sob o controle transcricional de AggR na amostra protótipo 042. Essa conclusão foi obtida por esses autores a partir do resultado em um experimento de RT-PCR para *shf* empregando uma amostra mutante no gene *aggR* (042::*aggR*). Esses autores relatam que a transcrição do gene *shf* foi abolida nesse mutante. Porém, ao analisar os resultados mostrados observa-se que a expressão de *shf* não é totalmente nula e sim nitidamente diminuída.

Partindo do princípio que AggR é o regulador global dos fatores de virulência plasmidiais e cromossômicos em EAEC, Mohamed *et al.* (2007) pesquisaram a habilidade de formar biofilme em isolados que carregavam outros genes como *aap*, *astA*, *irp-2*, *pet*, *setA*, *shf* e *aatA*, em amostras típicas e atípicas e constataram que, as que possuíam *aggR* eram maiores produtoras de biofilme, sugerindo assim que *aggR* regula também outros genes necessários para a formação de biofilme em EAEC. Algumas amostras agregativas, que não possuíam nenhum dos genes pesquisados, produziram biofilme. Este dado é um indício de que fatores adicionais estão envolvidos na produção de biofilme em EAEC.

EAEC vem sendo cada vez mais relacionada como um grupo de patógenos emergentes, devido à sua associação com diarreia aguda e persistente, tanto em países em desenvolvimento como em desenvolvidos (FLORES; OKHUYSEN, 2009; HUANG *et al.*, 2006; OKEKE, NATARO; 2001; WEINTRAUB, 2007).

Todos os estudos até hoje realizados, juntamente com os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que os vários potenciais fatores de

virulência de EAEC estão distribuídos heterogeneamente entre as amostras desse patótipo. Entre esses fatores, destaca-se o gene *shf* que é bastante prevalente e parece ser um importante marcador de virulência para esse patótipo. Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que o produto de *shf* está envolvido nos fenótipos de adesão agregativa e na capacidade de formação de biofilme, tanto em EAEC típica quanto em atípica. Entretanto, alguns pontos com relação à participação da proteína Shf nesses fenótipos necessitam ser esclarecidos, como por exemplo a sua localização celular. Na continuidade deste projeto, um clone que expressa a proteína Shf recombinante foi obtido em nosso laboratório e a produção de um antissoro poderá responder a essa questão, bem como avaliar se as amostras de EAEC atípicas realmente expressam essa proteína.

6 CONCLUSÕES

O gene *shf* foi encontrado em alta prevalência em EAEC típicas e atípicas isoladas de crianças com diarreia aguda em nosso país, e não houve diferenças entre as prevalências nesses dois grupos de EAEC.

As características de adesão em células HEp-2, sorogrupos e capacidade de formação de biofilme apresentadas pelas amostras que albergam o gene *shf* foram semelhantes nos grupos de EAEC típica e atípica.

O produto do gene *shf* está envolvido nos fenótipos de adesão agregativa e na capacidade de formação de biofilme em EAEC típica (amostra 042) e atípica (amostra 2871-1).

Na amostra de EAEC atípica 2871-1 o gene *shf* não é regulado pelo produto do gene *aggR*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABE, C. M.; KNUTTON, S.; PEDROSO, M. Z.; FREYMÜLLER, E.; GOMES, T. A. T. An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111:H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 203, p. 199-205, 2001.

ABE, C. M.; SALVADOR, F. A.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, M. A. M.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MACHADO, A. M. O.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R. T.; GOMES, T. A. T. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 52, p. 397-406, 2008.

ADACHI, J. A.; ERICSSON, C. D.; JIANG, Z. D.; DUPONT, M. W.; PALLEGAR, S. R.; DUPONT, H. I. Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 1681-1683, 2002.

ADACHI, J. A.; JIANG, Z.D.; MATHEWSON, J. J.; VERENKAR, M. P.; THOMPSON, S.; MARTINEZ-SANDOVAL, F.; STEFFEN, R.; ERICSSON, C. D.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 1706-9, 2001.

ALBERT, M. J.; QUADRI, F.; HAQUE, A.; BHUIYAN, N. A. Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1387-1399, 1993.

AL-HASANI, K.; RAJAKUMAR, K.; BULACH, D.; ROBINS-BROWNE, R.; ADLER, B.; SAKELLARIS, H. genetic organization of the *she* pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. **Microb. Pathog.**, v. 30, p. 1-8, 2001.

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

BENJAMIM, P.; FEDERMAN, M.; WANKE, C. A. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3417-3421, 1995.

* De acordo com:

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

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4302-4311, 2002.

BHAN, M.K.; BHATNAGAR, S. Persistent diarrhea in infants and young children. **Indian Pediatr.**, v. 30, p. 147-151, 1994.

BHAN, M.K.; RAJ, P.; LEVINE, M.M.; KAPER, J.B.; BHANDARI, N.; SRIVASTAVA, R.; KUMAR, R.; SAZAWAL, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. **J. Infect. Dis.**, v. 159, p. 1061-1064, 1989.

BHATNAGAR, S.; BHAN, M. K.; SOMMERFELT, H.; SAZAWAL, S.; KUMAR, R.; SAINI, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhea. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 25, p. 579-583, 1993.

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

BOOP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology** . 7. ed. Washington, D. C.: ASM Press, 1999. Cap. 28, p. 459-465.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; FARHOUDI-MOGHADDAM, A A.; SHOKOUHI, F.; PARSI, M. Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, p. 95-97, 1994.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; ZAREPOUR, M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. **Infect. Genet. Evol.**, v. 5, p. 79-83, 2005.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; 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.7, p.839-44, 2007.

CERNA, J.F.; NATARO, J.P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 2138-2140, 2003.

CHART, H.; SMITH, H. R.; ROWE, B. Enteroaggregative strains of *Escherichia coli* belonging to serotypes O126:H27 e O44:H18 express antigenically similar 18 kDa outer membrane-associated proteins. **FEMS microbial. Lett.**, v. 132, p. 17-22, 1995.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.29, p. 83-98, 2005.

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

COHEN, M. B.; NATARO, J. P.; BERNSTEIN, D. I.; HAWKINS, J.; ROBERTS, N.; STAAT, M. A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J. Pediatr.**, v. 146, p. 54-61, 2005.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 11, p. 217-21, 1999.

COBELJIC, M.; MILJKOVIC-SELIMOVIC, B.; PAUNOVIC-TODOSIJEVIC, D.; VELICKOVIC, Z.; LEPSANOVIC, Z.; ZEC, N.; SAVIC, D.; ILIC, R.; KONSTANTINOVIC, S.; JOVANOVIC, B.; KOSTIC, V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhea in a neonatal nursery ward. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 11-16, 1996.

CONNELL, I.; AGACE, W.; KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; MARILD, S.; SVANBORG, C. Type I fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 9827-9832, 1996.

CORDEIRO, F.; PEREIRA, D. S. G.; ROCHA, M.; ASENSI, M. D.; ELIAS, W. P.; CAMPOS, L. C. Evaluation of a multiplex PCR for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 828-829, 2008.

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

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **Lancet**, v. 337, p. 262-264, 1991.

CZECZULIN, J. R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4135-4145, 1997.

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

DEBROY, C.; YEALY, J.; WILSON, R. A.; BHAN, M. K.; KUMAR, R. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 2873-2879, 1995.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 881-90, 2002.

DONLAN; R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 167-92, 2002.

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

DUDLEY, E. G.; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MORIN, N. P.; NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 61; p. 1267-82, 2006b.

DURRER, P.; ZBINDEN, R.; FLEISCH, F.; ALTWEGG, M.; LEDERGERBER, B.; KARCH, H.; WEBER, R. Intestinal infection due to enteroaggregative *Escherichia coli* among human immunodeficiency virus- infected persons. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1540–1544, 2000.

ELIAS, W. P.; CZECHULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; TRABULSI, L. R.; NATARO, J. P. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II (AAF/II) defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1779-1785, 1999.

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

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

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. 4 ed. New York: Elsevier Publishing, 1986. 536 p.

FANG, G. D.; LIMA, A. A. M.; MARTINS, C. V.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, p. 137-144, 1995.

FARUQUE, S. M.; HAIDER, K.; ALBERT, M. J.; AHMAD, Q. S.; ALAM, A. N.; NAHAR, S.; TZIPORI, S. A comparative study of specific gene probes and standard bioassays to identify diarrhoeagenic *Escherichia coli* in pediatric patients with diarrhoea in Bangladesh. **J. Med. Microbiol.**, v. 36, p. 37-40, 1992.

FASANO, A.; NORIEGA, F. R.; MANEVAL, D. R. JR.; CHANASONGCRAM, S.; RUSSEL, R.; GUANDALINI, S.; LEVINE, M. M. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine *in vivo* and *in vitro*. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 2853-2861, 1995.

FOLKESSON, A.; LOFDAHL, S.; NORMARK, S. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. **Res. Microbiol.**, v.153, p. 537-545, 2002.

FLORES, J.; OKHUYSEN, P.C. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, p. 8-11, 2009.

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

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

GASCÓN, J.; VARGAS, M.; QUINTÓ, L.; CORACHÁN, M.; JIMENEZ DE ANTA, M.T.; VILA, J. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains as a cause of traveler's diarrhea: a case-control study. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 1409-12, 1998.

GERMANI, Y.; MINSSSART, P.; VOHITO, M.; YASSIBANDA, S.; GLAZIOU, P.; HOCQUET, D.; BERTHÉLÉMY, P.; MORVAN, J. Etiologies of acute, persistent, and dysenteric diarrheas in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus serostatus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 1008-1014, 1998.

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

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

GOMES, T. A.; ABE, C. M.; MARQUES, L. R. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 3364, 1995.

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

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

GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; WACHSMUTH, I. K.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 160, p. 131-135, 1989.

GONZÁLES, R.; DIAZ, C.; MARINO, M.; CLORALT, R.; PEQUENESE, M.; PEREZ-SCHAEEL, I. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1103-1107, 1997.

GUARNER, F.; MELAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 360, p. 512-519, 2003.

GUINÉE, P. A. M.; JANSEN, W. H.; WADSTRÖM, T.; SELLWOOD, R. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: LEEUW, P. W.; GUINÉE, P.A.M. (Ed.). **Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhea**: Current topics in veterinary and animal science. The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1981. p. 126-162.

GRIMES, K. A.; MOHAMED, J. A.; DUPONT, H. L.; PADDA, R. S.; JIANG, Z. D.; FLORES, J.; BELKIND-GERSON, J.; MARTINEZ-SANDOVAL, F. G.; OKHUYSEN, P. C. PCR-based assay using occult blood detection cards for detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in specimens from U.S. travelers to Mexico with acute diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, p. 2227-30, 2008.

KAHALI, S.; SARKAR, B.; RAJENDRAN, K.; KHANAM, J.; YAMASAKI, S.; NANDY, R.K.; BHATTACHARYA, S.K.; RAMAMURTHY, T. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4111-20, 2004.

HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, p. 154-5, 2007.

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

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

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

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

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.**; v. 6, p. 370-378, 1998.

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

HUANG, D. B.; MOHANTY, A.; DUPONT, H. L.; OKHUYSEN, P. C.; CHIANG, T. A review of emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1303-11, 2006.

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

JAFARI, F.; GARCIA-GIL, L. J.; SALMANZADEH-AHRABI, S.; SHOKRZADEH, L.; ASLANI, M. M.; POURHOSEINGHOLI, M. A.; DERAKHSHAN, F.; ZALI, M. R. Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. **J. Infect.**, v. 58, p. 21-27, 2009.

JENKINS, C.; CHART, H.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; SMITH, H. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* of both typical and atypical strains. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 55, p. 13-19, 2006a.

JENKINS, C.; TEMBO, M.; CHART, H.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G. A.; PHILLIPS, A. D.; TOMPKINS, D.; SMITH, H. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1493-1497, 2006b.

JIANG, Z. D.; GREENBERG, D.; NATARO, J. P.; STEFFEN, R.; DUPONT, H. L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in intestinal travelers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 4185-4190, 2002.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 80-128, 1991.

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

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-138, 2004.

KELLY, P.; HICKS, S.; OLOYA, J.; MWANSA, J.; SIKAKWA, L.; ZULU, I.; PHILLIPS, A. *Escherichia coli* enterovirulent phenotypes in Zambians with AIDS-related diarrhoea. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.97, p. 573–576, 2003.

KESKIMÄKI, M.; EKLUND, M.; PESONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v.40, p. 151-156, 2001.

KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; BHAN, M. K.; SMITH, H. R.; MCCONNELL, M. M.; CHEASTY, T.; WILLIAMS, P. H.; BALDWIN, T. J. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2083-2091, 1992.

KOO, H. L.; JIANG, Z. D.; BROWN, E.; GARCIA, C.; QI, H.; DUPONT, H. L. Coliform contamination of vegetables obtained from popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, p. 218–221, 2008.

LABIGNE-ROUSSEL, A; FALKOW, S. Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial-adhesin-encoding operon (*afa*) among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 640-648, 1988.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Pediatr. Suppl.**, v. 381, p. 39-44, 1992.

MATHEWSON, J. J., JOHNSON, P. C., DUPONT, H. L.; MORGAN, D. R.; THORNTON, S. A.; WOOD, L. V.; ERICSSON, C. D. A newly recognised cause of travellers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 151, p. 471–475, 1985.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L.; NATARO, J. P.; BELKIND-GERSON, J.; OKHUYSEN, P. C. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in

isolates from travelers to developing countries. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 121-126, 2007.

MONTEIRO-NETO, V.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; GIRON, J. A. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cell. Microbiol.**, v.5, p.533-547, 2003.

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

MOREIRA, C. G. **Fatores de virulência e o papel da fímbria tipo I na adesão agregativa de amostras de *Escherichia coli* do sorotipo O128:H35.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MOREIRA, C. G.; CARNEIRO, S. M.; NATARO, J. P.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 226, p. 79-85, 2003.

MOREIRA, F. C.; VIEIRA, M. A. M.; FERREIRA, A. J. P.; GIRÃO, D. M.; VAZ, T. M. I.; ROSA, C. P.; KNOBL, T.; IRINO, K.; FREYMÜLLER, E.; GOMES, T. A. T. *Escherichia coli* strains of serotype O151:H40 comprise typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains and are potentially diarrheagenic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 1462-1465, 2008.

MORENO, A. C. R.; FERNANDES-FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTENOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; SANTOS-FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, 2008. In press. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.017).

MOSSORO, C.; GLAZIOU, P.; YASSIBANDA, S.; LAN, N. T.; BEKONDI, C.; MINSSART, P.; BERNIER, C.; LE BOUGUÉNEC, C.; GERMANI, Y. Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEp-2 adherent *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3086-8, 2002.

NAKATA, N.; SASAKAWA, C.; OKADA, N.; TOBE, T.; FUKUDA, I.; SUZUKI, T.; KOMATSU, K.; YOSHIKAWA, M. Identification and characterization of *virK*, a virulence-associated large plasmid gene essential for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 2387-2395, 1992.

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.560-5, 1985.

NATARO, J.P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 465-4688, 1995.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; MANEVAL, D. R.; GERMAN, A. L.; MARTIN, W. C.; LEVINE, M. M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2297-2304, 1992.

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

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P. A.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W. C.; HEIMER, R.; TIRRELL, S.; EDBERG, S. C.; BRADEN, C. R.; GLENN MORRIS, J. J. R.; HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 402–407, 2006.

NATARO, J. P.; SERIWATANA, J.; FASANO, A.; MANEVAL, D. R.; GUERS, L. D.; NORIEGA, F.; DUBOVSKY, F.; LEVINE, M. M.; MORRIS, J. G. JR. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4721-4728, 1995.

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 251-261, 1998.

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

NAVARRO-GARCIA, F.; ESLAVA, C.; VILLASECA, J. M.; LÓPEZ-REVILLA, R.; CZEZULIN, J. R.; SRINIVAS, S.; NATARO, J. P.; CRAVIOTO, A. *In vitro* effects of a high-molecular weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3149-3154, 1998.

NAVARRO-GARCIA, F.; SEARS, C.; ESLAVA, C.; CRAVITO, A.; NATARO, J. P. Cytoskeletal effects induced by pet, the serino protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2184-2192, 1999.

NGUYEN, T. V.; VAN, P. L.; HUY, C. L.; NGUYEN-GIA, K.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 755–760, 2005.

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

NOVERR, C. M.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **Trends Microbiol.**, v. 12, p. 562-568, 2004.

OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A.; CZECHULIN, J.; DUBOVSKY, F.; KAPER, J. B.; NATARO, J. P. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 252-60, 2000.

OKEKE, I. N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet**, v. 1, 304-313, 2001.

OKEKE, I. N.; OJO, O.; LAMOKANRA, A.; KAPER, J. B. Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4525-30, 2003.

PABST, W. L.; ALTWEGG, M.; KIND, C.; MIRJANIC, S.; HARDEGGER, D.; NADAL, D. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 2289–2293, 2003.

PAI, M.; KANG, G.; RAMAKRISHMA, B. S.; VENKATARAMAN, A.; MULIYIL, J. An epidemic of diarrhoea in south India caused by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Indian J. Med. Res.**, v. 106, p. 7-12, 1997.

PARSOT, C. Shigella spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 252, p. 11-18., 2005.

PAUL, M.; TSUKAMOTO, T.; GHOSH, A. R.; BHATTACHARYA, S. K.; MANNA, B.; CHAKRABARTI, S.; NAIR, G. B.; SACK, D. A.; SEN, D.; TAKEDA, Y. The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India, and the demonstration of a new honeycombed pattern of aggregative adherence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 117, p. 319-326, 1994.

PEMFOLD, R. J.; PEMBERTON, J. M. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. **Gene**, v. 118, p. 145-146, 1992.

PEREIRA, A. C.; BRITTO-FILHO, J. D.; CARVALHO, J.; DE LUNA, M. G.; ROSA, A. C. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. **Microb. Pathog.**, v. 45, p. 310-314, 2008.

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

PINTO, M.; ROBINE-LEON, S.; APPAY, M. D.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; LACROIX, B.; SIMON-ASSMAN, P.; HAFFEN, K.; FOGH, J.; ZWEIBAUM, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Cell**, v. 47, p. 323-330, 1983.

PIVA, I.C.; PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S. N.; VIEIRA, A. C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; GIUGLIANO, L. G. Virulence markers of enteroagregative *Escherichia coli* from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1827-1832, 2003.

PUKATZKI, S.; MA, A. T.; STURTEVANT, D.; KRASTINS, B.; SARRACINO, D.; NELSON, W. C.; HEIDELBERG, J. F.; MEKELANOS, J. J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proced. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 1528-1533, 2006.

RAJAKUMAR, K.; LUO, F.; SASAKAWA, C.; ADLER, B. Evolutionary perspective on a composite *Shigella flexneri* 2a virulence plasmid-borne locus comprising three distinct genetic elements. **FEMS Microb. Lett.**, v. 144, p. 13-20, 1996.

RASKO, D. A.; ROSOVITZ, M. J.; MYERS, G. S.; MONGODIN, E. F.; FRICKE, W. F.; GAJER, P.; CRABTREE, J.; SEBAIHIA, M.; THOMSON, N. R.; CHAUDHURI, R.; HENDERSON, I. R.; SPERANDIO, V.; RAVEL, J. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 6881-93, 2008.

RAO, P. S.; YAMADA, Y.; TAN, Y. P.; LEUNG, K. Y. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Mol. Microbiol.**, v.53, p. 573-586, 2004.

REGUA-MANGIA, A. H.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Infect.**, v.48, p. 161-167, 2004.

REGUA-MANGIA, A. H.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L. M. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro city, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 414-422, 2009.

RILEY, L. M.; TEMIS, R. S.; HLGERTSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681-685, 1983.

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.

RODRIGUES, J.; ACOSTA, V. C.; CANDEIAS, J. M.; SOUZA, L. O.; FILHO, F. J. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1311-1318, 2002.

RODRIGUES, J.; SCALETISKY, I. C. A.; CAMPOS, M. 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.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-54, 2000.

RÜTLER, M. E.; YANZÓN, M. J.; CUITIÑO, N. F. R.; PIZARRO, M. A.; ORTIZ, A. M. Evolutin of a multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocell**, v. 30, p. 301-308, 2006.

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

SAMIE, A.; OBI, C. L.; DILLINGHAM, R.; PINKERTON, R. C.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human Immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 142-150, 2007.

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

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D. C.; LEVINE, M. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in a in vitro rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 1450-1455, 1991.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 3093-3097, 1993.

SAVARINO, S. J.; FOX, P.; YIKANG, D.; NATARO, J. P. Identification and charcterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli*

aggregative adherence fimbria I biogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4949-4957, 1994.

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

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

SCALETISKY, I. C.; FABBRICOTI, S. H.; SILVA, S. O.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. HEP-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 855-858, 2002b.

SCALETISKY, I. C.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-36, 1984.

SCOTLAND, S. M.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; ROWE, B.; HASSALL, J. E. Association of enteroaggregative *Escherichia coli* with travellers' diarrhea **J. Infect.**, v. 29, p. 115-6, 1994.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIE, S.; HEESEMAN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 701-705, 1995.

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

SCHULTZ, C.; VAN DEN ENDE, J.; COBELENS, F.; VERVOORT, T.; VAN GOMPEL, A.; WETSTEYN, J. C.; DANKERT, J. Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3550-4, 2000.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbial. Rev.**, v. 18, p. 264-292, 2005.

SHEIKH, J.; CZECZULIN, J. R.; HARRINGTON, S.; HENDERSON, I. R.; LE BOUGUÉNEC, C.; GOUNON, P.; PHILLIPS, A.; NATARO, J. P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 1329-37, 2002.

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

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

SMITH, H. R.; SCOTLAND, S. M.; WILLSHAW, G. A.; ROWE, B.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C. Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. **J. Infect. Dis.**, v. 170, p. 1610-1613, 1994.

SPENCER, J.; SMITH, H. R.; CHART, H. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from outbreaks of diarrhoeal disease in England. **Epidemiol. Infect.**, v. 123, p. 413-21, 1999.

SPEZIALE, P.; VISAI, L.; RINDI, S.; PIETROCOLA, G.; PROVENZA, G.; PROVENZANO, M. Prevention and treatment of *Staphylococcus* biofilms. **Curr. Med. Chem.**, v. 15, p. 3185-3195, 2008.

STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 88-96, 1998.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-8, 2001.

SUZART, S.; GUTH, B. E. C.; PEDROSO, M. Z.; OKAFOR, U. M.; GOMES, T. A. T. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, p. 163-168, 2001.

SVENUNGSSON, B.; LAGERGREN, A.; EKWALL, E.; EVENGÅRD, B.; HEDLUND, K. O.; KÄRNELL, A.; LÖFDAHL, S.; SVENSSON, L.; WEINTRAUB, A. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a year prospective study in a Swedish clinic for infectious disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 770-8, 2000.

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

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

UBER, A. P.; TRABULSI, L. R.; IRINO, K.; BEUTIN, L.; GHILARDI, A. C. R.; GOMES, T. A. T.; LIBERATORE, A. M. A.; CASTRO, A. F. P.; ELIAS, W. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 256, p. 251-257, 2006.

VEILLEUX, S.; HOLT, N.; SCHULTZ, B. D.; DUBREUIL, J. D. *Escherichia coli* EAST1 toxin toxicity of variants 17-2 and O 42. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 31, p. 567-578, 2008.

VELARDE, J. J.; VARNEY, K. M.; INMAN, K. G.; FARFAN, M.; DUDLEY, E.; FLETCHER, J.; WEBER, D. J.; NATARO, J. P. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, p. 1123-1135, 2007.

VERNACCHIO, L.; VEZINA, R. M.; MITCHELL, A. A.; LESKO, S. M.; PLAUT, A. G.; ACHESON, D. W. Diarrhea in American infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, p. 2-7, 2006.

VIAL, P.A.; ROBINS-BROWNE, R.; LIOR, H.; PRADO, V.; KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MANEVAL, D.; ELSAYED, A.; LEVINE, M. M. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **J. Infect. Dis.**, v. 158, p. 70-79, 1988.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J. M.; YAO, Y.; FISCHER, E. R.; DELEO, F. R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 54881-54886, 2004.

WAI, S. N.; TAKADE, A.; AMAKO, K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 135, p. 17-22, 1996.

WAKIMOTO, N.; NISHI, N.; SHEIKH, J.; NATARO, J. P.; SARANTUYA, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; KAWANO, Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, p. 687-690, 2004.

WATNICK, P. I.; KOLTER, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. **Mol. Microbiol.**, v. 34, p. 586-95, 1999.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 4-8, 2007.

WHITTAKER, C. J.; KLIER, C. M.; KOLENBRANDER, P. E. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 513-52, 1996.

ZAMBONI, A.; FABRICOTTI S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1058-1063, 2004.