

RENATO DE MELLO RUIZ

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA
DE MUTANTES NÃO ADERENTES
DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA ATÍPCA
DO SOROTIPO O125ac:H6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**São Paulo
2009**

RESUMO

RUIZ, R. M. **Caracterização genotípica e fenotípica de mutantes não aderentes de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica do sorotipo O125ac:H6.** 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O termo EPEC atípica é usado para definir as *Escherichia coli* enteropatogênicas que não transportam o plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*). O sorotipo O125ac:H6 compreende amostras de EPEC atípica que apresentam o gene *eae* e o padrão de adesão agregativa (AA) em células HEP-2. Estas amostras, apesar de apresentarem o padrão AA, não apresentam nenhum dos marcadores de virulência descritos do patótipo de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), incluindo as adesinas descritas até o momento. A análise da biblioteca genômica de uma amostra desse sorotipo escolhida como protótipo (amostra Ec292/84) identificou uma seqüência genética em um clone que expressava AA, a qual apresentou similaridade com o gene *ydhF*. Essa mesma amostra foi empregada na construção de um banco de mutantes com o transposon *TnphoA*, resultando na seleção de quatro mutantes não aderentes. Com base nessas informações, o presente estudo objetivou a caracterização genotípica e fenotípica desses mutantes. A análise genética dos mesmos demonstrou a presença dos principais genes de virulência de EPEC atípica e do gene *ydhF* íntegro. O mutante Ec2921/84::01 foi escolhido para os experimentos de caracterização do local da inserção do *TnphoA*. As regiões adjacentes à inserção do transposon foram amplificadas, obtendo-se dois fragmentos de 1.000 e 800 pb, correspondendo às regiões *upstream* e *downstream* à inserção do *TnphoA*. Esses fragmentos foram clonados, gerando os clones pRMR1 e pRMR2, respectivamente. A análise do seqüenciamento de nucleotídeos do inserto do pRMR1 revelou a presença de parte do gene *secD*, o qual codifica uma proteína componente do sistema de secreção de proteínas do tipo 2 (SST2) de bactérias. A presença dos genes do operon no qual o gene *secD* encontra-se inserido (*yajCsecDF*) também foi pesquisada, confirmando que a inserção do *TnphoA* no mutante Ec2921/84::01 ocorreu em *secD*. O perfil de proteínas de membrana externa (OMP) do mutante, em comparação com a amostra selvagem, revelou a ausência da expressão de proteínas de 21 e 30 kDa no perfil do mutante. Sabendo-se que o padrão AA da amostra protótipo é inibido a 18 °C, o perfil de OMP também foi determinado sob essa condição de cultivo, demonstrando a perda da expressão das proteínas de mesmas massas moleculares. Um antissoro obtido contra o extrato de OMP da amostra protótipo, além de inibir o padrão AA, reconheceu a proteína de 30 kDa em *immunoblottings* utilizando extratos de OMP da mesma amostra. Esses dados indicam que a OMP de 30 kDa está envolvida no estabelecimento do padrão AA apresentado pelas amostras de EPEC atípica do sorotipo O125ac:H6 e que essa proteína é transportada através do SST2.

Palavras-chave: Diarréia. *Escherichia coli*. Proteínas de Membrana. Sistema de Secreção.

ABSTRACT

RUIZ, R. M. **Genotypic and phenotypic characterization of nonadherent mutants of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* of serotype O125ac:H6.** 100 f. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The term atypical EPEC is employed to define the enteropathogenic *Escherichia coli* strains that lack the EAF (EPEC adherence factor) plasmid. The serotype O125ac:H6 comprises atypical EPEC strains that harbor the *eae* gene and express the aggregative adherence (AA) pattern to HEp-2 cells. Although these strains present the AA pattern, they lack all virulence markers described in the enteroaggregative *E. coli* (EAEC) pathotype, including the adhesins so far described. The analysis of a genomic library of one strain of this serotype, chosen as prototype (strain Ec292/84), identified a gene sequence in a AA-expressing clone, which presented homology with the *ydhF* gene. This same strain was employed in the construction of a collection of mutants with the *TnphoA* transposon, resulting in the selection of four nonadherent mutants. Therefore, the objective of this study was the genetic and phenotypic characterization of these mutants. The genetic analysis demonstrated the presence of the main virulence genes of atypical EPEC and the intact presence of *ydhF* in all mutants. The Ec2921/84::01 mutant was chosen for the experiments to determine the site of *TnphoA* insertion. The flanking regions of the *TnphoA* insertion were amplified, generating two fragments of 1.000 and 800 bp, corresponding to the upstream and downstream insertion regions, respectively. These fragments were cloned, generating the clones pRMR1 and pRMR2, respectively. The nucleotide sequence analysis of the pRMR1 insert revealed the presence of part of the *secD* gene, which encodes a protein component of the bacterial type 2 secretion system (T2SS). The presence of the genes contained in the operon where *secD* is located (*yajCsecDF*) was also searched, confirming that the *TnphoA* insertion in mutant Ec2921/84::01 occurred in *secD*. The mutant outer membrane proteins (OMP) profile, in comparison to the prototype strain, demonstrated the lack of expression of proteins of 21 and 30 kDa in the mutant profile. Considering that the AA pattern of the prototype strain is inhibited at 18 °C, its OMP profile was also analyzed under this growth condition, revealing the lack of expression of the proteins of same molecular weight. An antiserum raised against the OMP extract of the prototype strain, in addition to inhibit the AA pattern, recognized the 30 kDa protein in immunoblotting assays of the same strain. These data indicate that the 30 kDa OMP is involved in the establishment of the AA pattern presented by the atypical EPEC strains of the O125ac:H6 serotype, and that this protein is transported via the T2SS.

Key-words: Diarrhea. *Escherichia coli*. Membrane Protein. Secretion System.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa da família Enterobacteriaceae, componente da microbiota intestinal humana e também responsável por importantes processos patológicos. 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).

Além da *E. coli*, a microbiota intestinal nos indivíduos adultos é basicamente composta pelos gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, dentre outros (GUARNER; MELAGELADA, 2003). Essa microbiota tem como funções a fermentação de resíduos alimentares não digeridos, a produção de vitamina K, a absorção de ferro e cálcio, atua no desenvolvimento do intestino, controlando a proliferação e diferenciação do epitélio intestinal, além de exercer funções protetoras, impedindo a colonização e a proliferação de organismos oportunistas (GUARNER, 2006).

Em indivíduos imunodeprimidos, ou quando a barreira gastrointestinal é violada, algumas cepas não patogênicas de *E. coli* podem causar infecções extra-intestinais, tais como infecções do trato urinário, meningite, bacteremia e sepse, sendo então classificadas como *E. coli* extra-intestinais (NATARO; KAPER, 1998). Além disso, alguns clones específicos de *E. coli* são causadores de infecções intestinais sempre que alcançam esse sítio anatômico humano, não sendo, portanto, membros da microbiota intestinal. Essas amostras são chamadas de *E. coli* diarreio gênicas (DEC) (NATARO; KAPER, 1998).

1.2 *Escherichia coli* diarreio gênicas

As doenças bacterianas infecciosas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade (COHEN, 2000) e dentre elas destacam-se as infecções intestinais, responsáveis por cerca de 2 milhões de mortes por ano, principalmente entre crianças de países em desenvolvimento (O'RYAN *et al.*, 2005). A *E. coli* é o

agente de uma grande proporção desses processos infecciosos, classificados como diarreia ou disenteria (CLARKE *et al.*, 2001).

Ao longo da evolução, alguns clones de *E. coli* adquiriram fatores de virulência, o que lhes conferiram a capacidade de causar infecções intestinais (KAPER *et al.*, 2004). As amostras de *E. coli* diarreiogênicas, tanto em crianças como em adultos, 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 de DEC 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, torna-se evidente 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 (KAPER *et al.*, 2004).

A EPEC foi descrita em 1945 durante um surto de diarreia infantil no Reino Unido, sendo considerada um importante patótipo de DEC associado a casos de diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento, principalmente na infância (BRAY, 1945; NATARO; KAPER, 1998). As amostras de EPEC têm a capacidade de causar uma lesão histopatológica em biópsias intestinais, bem como em cultura celular, denominada lesão *attaching and effacing* (A/E), além de não secretarem a toxina de Shiga (Stx) (KAPER, 1996). O diagnóstico das EPEC pode ser realizado através de métodos sorológicos, com base na detecção de um dos antígenos O definidos para esse patótipo pela Organização Mundial da Saúde. São esses sorogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WHO, 1987). Entretanto, essa metodologia pode levar à detecção de outros patótipos de DEC, uma vez que alguns desses sorogrupos são constituídos por sorotipos que correspondem a outros patótipos de DEC (TRABULSI *et al.*, 2002; CAMPOS *et al.*, 2004). A detecção por métodos moleculares ou imunológicos dos genes de virulência, ou dos seus produtos, envolvidos no estabelecimento da lesão A/E também pode ser empregada (NATARO, 1996).

A ETEC é o patótipo de DEC capaz de elaborar 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, geralmente chamada de diarreia do viajante. Estima-se que a colonização por ETEC seja rápida, com um período de incubação de algumas horas (DALTON *et al.*, 1999). O diagnóstico das ETEC é realizado através da detecção das toxinas ST ou LT, através de métodos moleculares ou imunológicos, bem como da detecção dos fatores de colonização (NATARO; KAPER, 1998).

A EIEC apresenta a capacidade de invadir e multiplicar-se em células epiteliais intestinais, tal como *Shigella* spp., causando colite inflamatória e disenteria (KAPER *et al.*, 2004). O mecanismo de patogênese das EIEC consiste da invasão da mucosa intestinal, seguido de fagocitose e lise do vacúolo endocítico, multiplicação celular, movimentação no citoplasma e passagem para as células adjacentes (PARSOT, 2005). O diagnóstico de EIEC consiste na verificação da capacidade invasora em células epiteliais cultivadas ou em olho de cobaia, como também na pesquisa molecular de genes associados com o processo de invasão (NATARO; KAPER, 1998).

A STEC foi primeiramente identificada nos Estados Unidos em 1982 como agente de um surto de diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica urêmica (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 síndrome hemolítica urêmica, 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). O diagnóstico das STEC baseia-se na detecção da toxina Stx através de ensaios celulares ou imunológicos, ou pela pesquisa das seqüências genéticas responsáveis por codificar essa toxina (NATARO; KAPER, 1998). No caso das EHEC, além da pesquisa de Stx, a detecção dos genes envolvidos no estabelecimento da lesão A/E, ou dos seus produtos, também é empregada (FRANKEL *et al.*, 1998).

A DAEC foi assim denominada devido ao padrão de adesão 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. Esse padrão foi denominado adesão difusa (AD) (ELLIOT; NATARO, 1995). A associação de DAEC com diarreia é controversa, uma vez que vários estudos epidemiológicos não associam esse patótipo à doença diarreica (NATARO *et al.*, 1987; GOMES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2002). O diagnóstico empregado para a detecção deste patótipo reside no teste de adesão em células HeLa ou HEP-2, onde se observa o padrão AD. Uma sonda genética que corresponde a um dos genes do operon que codifica a fímbria F1845, descrita em uma amostra de DAEC, é comumente empregada na detecção de DAEC por métodos moleculares, entretanto apresenta baixa especificidade e sensibilidade devido à baixa prevalência dessa adesina em amostras de DAEC (CAMPOS *et al.*, 1999).

A EAEC é definida como o patótipo de *E. coli* que adere a células epiteliais cultivadas em um padrão denominado adesão agregativa (AA). Esse termo foi estabelecido para definir o padrão de adesão em células HEP-2 de algumas amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico realizado no Chile, envolvendo crianças com diarreia (NATARO *et al.*, 1987). 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). As manifestações clínicas resultantes da infecção por EAEC são a diarreia aguda e persistente (HARRINGTON *et al.*, 2006). O padrão AA demonstrado no teste de adesão em células HeLa ou HEP-2 é usado como diagnóstico para as amostras de EAEC (NATARO; KAPER; 1998), uma vez que não existe um determinante genético comum para todas as amostras deste patótipo (HARRINGTON *et al.*, 2006). Entretanto, uma sonda genética que corresponde a um fragmento do plasmídeo de virulência da amostra protótipo 042, conhecida como sonda AA ou EAEC, é amplamente empregada na detecção de amostras de EAEC, embora detecte apenas amostras de EAEC que albergam esse plasmídeo de virulência (BAUDRY *et al.*, 1990; HARRINGTON *et al.*, 2006).

1.3 *Escherichia coli* enteropatogênica

As EPEC constituem o patótipo de DEC com a capacidade de produzir a lesão histopatológica A/E, além de não produzir a toxina Stx de STEC (KAPER, 1996). 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 por acúmulo de actina polimerizada, onde a bactéria permanece aderida (MOON *et al.*, 1983). Essa lesão pode ser observada em mucosa de animais e humanos experimentalmente infectados, bem como células epiteliais cultivadas. Knutton *et al.* (1989) desenvolveram um teste denominado *fluorescent actin staining* (FAS), onde a faloidina marcada com isotiocinato fluorescente se liga à actina polimerizada abaixo de cada bactéria aderida, sendo possível detectar indiretamente a lesão A/E *in vitro*. Antes do desenvolvimento do teste de FAS, a lesão A/E só podia ser observada através de microscopia eletrônica de transmissão.

As proteínas envolvidas na formação da lesão A/E são codificadas pelos genes presentes em uma ilha de patogenicidade de 35,6 kb, denominada *locus of enterocyte effacement* ou região LEE (ELLIOT *et al.*, 1998). Os genes que fazem parte da região LEE estão organizados em cinco operons de funções conhecidas: LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4 e LEE 5 (MELLIES *et al.*, 1999; SANCHES-SANMARTIN *et al.*, 2001).

A região LEE 5 contém os genes *eae* (*E. coli attaching and effacing*), que codifica a adesina intimina que medeia a aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal; *tir* (*translocated intimin receptor*), que codifica o receptor da intimina (Tir), o qual é translocado para a célula hospedeira através do sistema de secreção do tipo III e inserido na membrana da célula hospedeira; *map* (*mitochondrial associated protein*), que atua na membrana da mitocôndria causando uma disfunção no potencial de membrana; e *cesT* que é a chaperonina de Tir e Map (SANCHES-SANMARTIN *et al.*, 2001).

As regiões LEE 1, LEE 2 e LEE 3 contêm os genes que codificam as proteínas necessárias para o sistema de secreção do tipo III, chamadas Esc (*EPEC secretion*) e Sep (*secretion of EPEC proteins*), além do regulador *ler* (*LEE-encoded regulator*) (ELLIOT *et al.*, 1998). As EPEC utilizam o sistema de secreção do tipo III para injetar proteínas efetoras na membrana plasmática e no citoplasma da célula

hospedeira (HUECK, 1998). Um complexo protéico formado pelas proteínas EscD, R, S, T e U forma um poro na membrana interna da bactéria; EscJ forma um canal no espaço periplasmático conectando a membrana externa a membrana interna; EscF se projeta pela membrana externa, formando um canal ao qual EspA liga-se diretamente, formando um canal até a célula hospedeira; e EscN está relacionada com conversão da energia para a secreção (GAUTHIER; FINLAY, 2002). Nove desses genes apresentam homologia com os genes *ysc* do aparato de secreção de *Yersinia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. (FRANKEL *et al.*, 1998).

A região LEE 4 contém os genes que codificam as proteínas secretadas Esp (*EPEC-secreted proteins*) que são produzidas durante o curso da infecção (NATARO; KAPER, 1998) e são secretadas pelo sistema de secreção do tipo III. EspA é uma proteína estrutural filamentosa, localizada na superfície bacteriana, que interage como epitélio celular nos primeiros estágios da lesão A/E, formando um canal para translocação de efetores para a célula hospedeira (KNUTTON *et al.*, 1998). EspB e EspD formam um complexo poroso no epitélio celular através do qual as proteínas serão translocadas (GARMENDIA *et al.*, 2005). EspF, que é secretada para o interior da célula hospedeira, atua na destruição das junções oclusivas do epitélio intestinal (McNAMARA, *et al.*, 2001). Essas proteínas podem ser separadas em dois grupos funcionais: efetores translocados (Tir, EspF, EspG) e componentes do aparato de translocação (EspA, EspB, EspD).

Além da região LEE, as EPEC apresentam um plasmídeo denominado EPEC *adherence factor* (EAF) que varia entre 50 a 70 MDa (BALDINI *et al.*, 1983), o qual contém os genes envolvidos com a biogênese de uma adesina fimbrial denominada *Bundle-forming pilus* (BFP) e do operon *plasmid-encoded regulator* (*per*), o qual codifica um complexo regulador dos genes de virulência de EPEC (TRABULSI *et al.*, 2002).

A adesina BFP é uma fímbria do tipo IV organizada na forma de feixes relacionada à adesão localizada das EPEC à célula hospedeira (GIRÓN *et al.*, 1991), o que pode ser evidenciado *in vitro* e *in vivo* através da formação de microcolônias bacterianas em pontos específicos da superfície celular (SCALETSKY *et al.*, 1984; KNUTTON *et al.*, 1987).

O complexo regulador PerABC, homólogo da família AraC de ativadores transcricionais, ativa a transcrição do operon *bfp*, bem como da região LEE, especificamente através da ativação de LEE 1 (MELLIES *et al.*, 1999).

Além dos operons *bfp* e *per*, o plasmídeo EAF contém uma seqüência genética críptica de 1 kb, denominada fragmento sonda EAF (NATARO *et al.*, 1985). Esse fragmento foi selecionado como sonda genética para a identificação de EPEC, e tem sido amplamente empregado com essa finalidade. Entretanto, amostras de EPEC pertencentes aos sorogrupos O clássicos, que apresentam os genes da região LEE e são capazes de causar a lesão A/E, mas não são reativas com a sonda EAF, já foram descritas (LEVINE *et al.*, 1984; GOMES *et al.*, 1989).

Devido a esse fato, nos últimos anos o patótipo EPEC foi subdividido nos grupos EPEC típica e atípica (TRABULSI *et al.*, 2002). O termo EPEC atípica foi sugerido durante o Simpósio Internacional de *Escherichia coli* Enteropatogênica, realizado na cidade de São Paulo em 1995, para denominar amostras de EPEC que não transportam o plasmídeo EAF (KAPER, 1996).

Enquadra-se na definição de EPEC atípica uma vasta série de amostras de *E. coli* que aparentemente emergiu recentemente e já estão entre os principais agentes de diarreia em nosso meio e em outros países, (GOMES *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1996; TRABULSI *et al.* 2002; AFSET *et al.*, 2003; COHEN *et al.*, 2005; FRANZOLIN *et al.*, 2005; ORLANDI *et al.*, 2006; BUERIS *et al.*, 2007). Estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado uma sobreposição do número de EPEC atípicas em relação às EPEC típicas em números de casos (AFSET *et al.* 2003, 2004; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004; FRANZOLIN *et al.*, 2005; BUERIS *et al.*, 2007), posicionando as EPEC atípicas como patógenos emergentes.

Há vários anos as EPEC atípicas são encontradas em associação com diarreia da criança (SMITH *et al.*, 1996; TRABULSI *et al.*, 1996). Além da associação com diarreia endêmica, surtos de diarreia e casos de diarreia persistente causadas por esse grupo de EPEC já foram descritos (VILJANEN *et al.*, 1990; HEDBERG *et al.*, 1997; YATSUYANAGI *et al.*, 2003, NGUYEN *et al.*, 2006). Os estudos realizados no Brasil também têm demonstrado associação com diarreia endêmica da criança (SCALETSKY *et al.*, 1999; ORLANDI *et al.*, 2006; ARAUJO *et al.*, 2007; BUERIS *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2008).

As EPEC típicas e atípicas também diferem em relação ao padrão de adesão. Enquanto as EPEC típicas apresentam o padrão de adesão localizado (AL), no qual as bactérias apresentam-se aderidas em pontos localizados da célula formando grupos compactos (SCALETSKY *et al.*, 1984), as EPEC atípicas podem aderir ou não às células HEp-2. As amostras aderentes expressam predominantemente o

padrão localizado-*like* (AL-L), no qual as bactérias apresentam-se aderidas em pontos isolados da célula epitelial, formando microcolônias frouxas, o que é evidenciado após períodos prolongados de interação bactéria-célula epitelial (RODRIGUES *et al.*, 1996; PELAYO *et al.*, 1999; SCALETISKY *et al.*, 1999). Além do padrão AL-L os padrões AA (do VALLE *et al.*, 1997; BARROS *et al.*, 2008) e AD (TRABULSI *et al.*, 2002) também são expressos por amostras de EPEC atípica. Os padrões AA e AD são característicos das EAEC e DAEC, respectivamente. Algumas amostras de EPEC atípicas podem ainda expressar o padrão AL após 6h de interação bactéria-célula epitelial (HERNANDES *et al.*, 2006).

A patogênese da diarreia causada pelas EPEC atípicas é semelhante às EPEC típicas e baseia-se na formação da lesão A/E. Além disso, as amostras deste subgrupo podem ainda apresentar fatores de virulência adicionais, presentes em outros patótipos de DEC. A toxina EAST-1 descrita no patótipo EAEC como uma toxina termo-estável homóloga à toxina ST de ETEC, foi encontrada em amostras de EPEC atípica (DULGUER *et al.*, 2003). A enterohemolisina (E-hly) associada ao patótipo de EHEC (BEUTIN *et al.*, 1988) também foi encontrada em amostras de EPEC atípicas (COOKSON *et al.*, 2007). A adesina fimbrial Afa (*diffuse adherence fibrillar adhesin*), presente em amostras de DAEC, foi descrita por Keller *et al.* (2002) em um estudo com amostras de EPEC atípica do sorogrupo O55. A adesina LDA (*locus for diffuse adhesion*) foi descrita por Scaletsky *et al.* (2005) a partir de estudos com amostras de EPEC atípica do sorotipo O26:H11 que apresentam o padrão AL-L.

As EPEC atípicas descritas em vários estudos epidemiológicos são altamente heterogêneas em termos dos sorotipos, padrões de adesão e fatores de virulência adicionais (VIEIRA *et al.*, 2001; SCALETISKY *et al.*, 2002; DULGUER *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004; NGUYEN *et al.*, 2006; ARAUJO *et al.*, 2007; AFSET *et al.*, 2008), característica bastante distinta das EPEC típicas (TRABULSI *et al.*, 2002).

Os sorotipos de EPEC atípica podem pertencer ou não aos chamados sorogrupos clássicos de EPEC (CAMPOS *et al.*, 2004). Quando pertencentes aos sorogrupos clássicos, as EPEC atípicas geralmente diferem das EPEC típicas basicamente pelos antígenos H. Dentre esses sorotipos, os mais freqüentes são: O26:H11, O26:HNM, O55:H7, O55:HNM, O55:H34, O86:H8, O111:H9, O111:H25, O111:HNM, O119:H2, O125ac:H6 e O128:H2. Entretanto, alguns sorogrupos mais

incomuns relacionado com casos de diarreia, foram identificados como EPEC atípicas; como por exemplo, os antígenos O34, O51 e O101 (TRABULSI *et al.*, 2002; BLANCO *et al.*, 2006).

1.4 Sorotipo O125ac:H6

Historicamente o sorotipo O125:H6 foi inicialmente classificado como pertencente ao patótipo EPEC. As *E. coli* do sorogrupo O125, foram isoladas primeiramente por Taylor e Charter (1952), em um surto ocorrido em uma unidade hospitalar infantil em Londres. As amostras deste surto foram denominadas “Canioni” e pertenciam ao sorotipo O125ab:H19. Desde então este sorogrupo tem sido isolado de casos de diarreia em crianças em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (EWING *et al.*, 1963; KITAGAWA *et al.*, 1989; do VALLE *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2003; JENKINS *et al.*, 2006; PRÉRE *et al.*, 2006).

Ewing *et al.* (1963) demonstraram que o antígeno somático O do sorogrupo O125, poderia ser dividido em dois subtipos O125ab e O125ac, associados a diferentes tipos de antígenos flagelares.

Em um estudo de caracterização fenotípica e genotípica de amostras do sorogrupo O125 isoladas de casos de diarreia em São Paulo, do Valle *et al.* (1997) demonstraram que a maioria dos sorotipos que compõem esse sorogrupo pertencem ao patótipo EAEC, enquanto que as amostras do sorotipo O125ac:H6 foram classificadas como EPEC atípicas, visto que estas apresentavam o gene *eae* e não albergavam o gene *bfpA* (que codifica a principal subunidade da fímbria BFP). Esses mesmos autores descreveram que as amostras deste sorotipo aderiam a células HeLa em um padrão não característico (do Valle *et al.*, 1997).

Elias *et al.* (2002) descreveram que as amostras do sorotipo O125ac:H6 apresentavam apenas o gene *eae* de EPEC e nenhum dos marcadores de virulência de EAEC, embora apresentassem o padrão AA em células HEp-2 após 6h de contato bactéria-célula epitelial.

Os diferentes padrões de adesão relatados por esses autores para essas mesmas amostras pode estar relacionado às diferentes linhagens celulares empregadas (HeLa e HEp-2). O padrão AA apresentado por esse sorotipo foi

confirmado em outras linhagens de origem intestinal, tais como Caco-2, HT29 e T84 (BARROS *et al.*, 2008).

Essa combinação entre a presença do gene *eae*, que codifica a adesina intimina de EPEC, e o fenótipo agregativo de adesão em amostras de *E. coli* pertencentes a um sorogrupo de EPEC, constitui-se em um achado intrigante, uma vez que a maioria das amostras de EPEC atípica expressam o padrão AL-L (TRABULSI *et al.*, 2002). Diante desses dados, tornou-se relevante caracterizar a nível molecular essas amostras, levando-se em conta a pesquisa e caracterização da adesina que medeia o padrão AA nesse sorotipo, além de verificar a funcionalidade da região LEE dessas amostras.

Barros *et al.* (2008), estudando seis amostras desse sorotipo, verificou que embora todos os genes da região LEE de EPEC estivessem presentes, e que intimina, Tir, EspA, EspB e EspD estivessem sendo expressas, a formação da lesão A/E não ocorria em células HEp-2, Caco-2, HT29 e T84. Recentemente, Bai *et al.* (2008) detectaram a capacidade de uma amostra do sorotipo O125:H6 em causar a lesão A/E em biópsias intestinais cultivadas, empregando o sistema de *in vitro organ culture* (IVOC), demonstrando assim a funcionalidade da região LEE dessa amostra. Entretanto, após a translocação de Tir para a célula eucariótica, não ocorre a sua fosforilação, diferindo do comportamento de amostras de EPEC típica, onde após a fosforilação de resíduos de tirosina, Tir se liga às proteínas Nck e/ou TccP/TccP2 para ativar N-WASP e disparar a polimerização da actina mediada pela proteína Arp2/3, culminando no rearranjo do citoesqueleto e na formação do pedestal onde a bactéria está aderida (CARON *et al.*, 2006). Dessa forma, as etapas de ativação da polimerização da actina em amostras do sorotipo O125:H6 são mediadas por proteínas ainda não caracterizadas (BAI *et al.*, 2008).

1.5 Adesinas que medeiam o padrão agregativo de aderência em células epiteliais

A adesão bacteriana à superfície do hospedeiro é uma importante etapa da colonização do trato gastrointestinal. A adesão é essencial na manutenção dos membros da microbiota, bem como para os patógenos. Associa-se o processo de adesão bacteriana a proteínas estruturais que podem ser divididas em adesinas fimbriais e afimbriais (TORRES *et al.*, 2005).

As adesinas fimbriais, ou fímbricas, são grupos de rígidos apêndices filamentosos na superfície bacteriana, principalmente nas bactérias Gram-negativas, ancoradas na membrana externa. Elas são formadas por subunidades que medeiam a adesão através de específicas interações com estruturas superficiais (receptores) na membrana da célula hospedeira (GERLACH; HENSEL, 2007).

Diversos autores demonstraram que o padrão AA está associado à presença de adesinas em amostras de EAEC através de estudos de microscopia eletrônica e de hemaglutinação (LAW; CHART, 1998). Qadri *et al.* (1994) descreveram diversos padrões de hemaglutinação manose resistente, na maioria de amostras de EAEC isoladas de diferentes localidades, sugerindo uma heterogeneidade dentro do patótipo EAEC com relação à expressão de diferentes tipos de hemaglutininas, ou adesinas, para a superfície da mucosa intestinal.

A presença de fímbricas apresentando diferentes morfologias tem sido descrita em diversas amostras de EAEC, através de estudos de microscopia eletrônica de transmissão (VIAL *et al.*, 1988; YAMAMOTO *et al.*, 1992; KNUTTON *et al.*, 1992).

Knutton *et al.* (1992) descreveram quatro tipos morfologicamente distintos de fímbricas expressas por amostras de EAEC, associadas à adesão agregativa em células HEp-2. A presença de fímbricas, fibrilas e feixes fimbriais, foi também observada em amostras de EAEC por Suzart *et al.* (1999). As amostras estudadas apresentaram diversos padrões de hemaglutinação, entretanto nenhum desses padrões foi associado a um tipo específico de adesina.

Old *et al.* (1989) identificaram uma adesina fibrilar, presente em duas amostras de EAEC do sorogrupo O78, capaz de mediar a aglutinação de hemácias de rato e de camundongo em presença de manose.

Entretanto, apenas as estruturas fimbriais denominadas *Aggregative Adherence Factor* (AAF) I, II e III foram caracterizadas ao nível ultraestrutural e molecular (NATARO *et al.*, 1992; CZECZULIN *et al.*, 1997; BERNIER *et al.*, 2002).

Nataro *et al.* (1992) descreveram a primeira fímbrica relacionada com o padrão AA. A fímbrica *aggregative adherence fimbriae I* (AAF/I) foi descrita na amostra 17-2 (sorotipo O3:H2), isolada de um caso de diarreia infantil no Peru, como uma estrutura de feixes frouxos constituídos por fímbricas apresentando de 2 a 3 nm de diâmetro. AAF/I está associada à presença de um plasmídeo de 60 MDa (pAA1) e é responsável pelo padrão AA em células HEp-2 e aglutinação manose-resistente de eritrócitos humanos em suspensão (NATARO *et al.*, 1992). Os genes envolvidos na

biogênese de AAF/I são codificados pelo operon *aggABCD* (SAVARINO *et al.*, 1994). Entretanto, a fímbria AAF/I não está presente em todas as amostras de EAEC (ELIAS *et al.*, 1999).

A fímbria *aggregative adherence fimbriae II* (AAF/II) foi descrita por Czczulin *et al.* (1997) na amostra 042 (sorotipo O44:H18), isolada de um caso de diarreia infantil no Chile. Essa adesina medeia o padrão AA e a hemaglutinação manose-resistente de eritrócitos humanos e foi visualizada através de microscopia eletrônica de transmissão como uma estrutura rígida de 5 nm de diâmetro. (NATARO *et al.*, 1995; CZECZULIN *et al.*, 1997). Os genes envolvidos na biogênese de AAF/II são codificados pelos genes *aafABCD* localizados em duas regiões não contíguas de um outro plasmídeo (pAA2) associado à virulência de EAEC (ELIAS *et al.*, 1999). A sua prevalência em EAEC também é baixa (ELIAS *et al.*, 1999).

Uma terceira fímbria, *aggregative adherence fimbriae III* (AAF/III) foi caracterizada a partir de uma biblioteca genômica da amostra de EAEC 55989 isolada de um caso de diarreia persistente, a qual apresentava o padrão AA e não apresentava nenhuma das outras duas fímbrias descritas anteriormente. Um clone que apresentava o padrão semelhante ao da amostra selvagem foi escolhido e submetido à análise através de microscopia eletrônica, a qual identificou estruturas fibrilares na superfície bacteriana (BERNIER *et al.*, 2002). Os genes envolvidos na biogênese de AAF/III são codificados pelo operon *agg3ABCD* (BERNIER *et al.*, 2002).

Recentemente, Boisen *et al.* (2008) identificaram a adesina HdaA (*HUS-associated diffuse adherence*) como responsável pelo padrão agregativo da amostra C1010-00 (sorotipo OR:H1), isolada de um caso de diarreia na Dinamarca. Os genes que codificam essa pilina foram inicialmente localizados no plasmídeo de uma amostra de *E. coli* associada com um caso de síndrome hemolítica urêmica e que apresenta o padrão difuso de aderência (Número de acesso no GenBank: YP787988). HdaA apresenta relação filogenética com outras fímbrias da família Afa/Dr/AAF, sugerindo que essa adesina representa uma importante variante das fímbrias de EAEC até então descritas. Ela apresenta a capacidade de aglutinar eritrócitos bovinos e humanos em presença de manose e não há relatos sobre a sua ultraestrutura até o presente momento (BOISEN *et al.*, 2008). Os genes envolvidos na biogênese de HdaA são codificados pelo operon *hdA3ABCD* (BOISEN *et al.*, 2008).

As amostras de EAEC que expressam as fímbrias AAF/I, II ou III são categorizadas como EAEC típicas, uma vez que apresentam o gene *aggR* (HARRINGTON *et al.*, 2006). AggR apresenta homologia com reguladores positivos da expressão de adesinas de *E. coli*, tais como CfaR, Rns, CsvR e Per, os quais são membros da família AraC de proteínas que se ligam a DNA (NATARO *et al.*, 1994). Empregando experimentos de mutagênese e de análise de RNA mensageiro, foi demonstrado que AggR é necessário para expressão dos genes da biogênese das fímbrias AAF/I e AAF/II, além de outros genes de virulência, sendo então considerado um regulador global de EAEC típica (HARRINGTON *et al.*, 2006).

No intuito de caracterizar o determinante genético relacionado com a adesão agregativa apresentada pela amostra de EAEC atípica C1096 (sorotipo O4:HNT), isolada de um surto de diarreia na Sérvia, foi identificado um pilus do tipo IV, codificado por genes localizados no plasmídeo pSERB1 pertencente ao grupo de incompatibilidade IncI1 (COBELJIC *et al.*, 1996; DUDLEY *et al.*, 2006). A expressão desse pilus tipo IV é necessária, mas não completamente responsável pela adesão agregativa nessa amostra de EAEC atípica (DUDLEY *et al.*, 2006).

Adesinas não fimbriais são proteínas associadas à superfície bacteriana, ou proteínas de membrana externa (OMP) (GERLACH; HENSEL, 2007). Algumas OMP foram descritas como associadas ao estabelecimento do padrão AA.

Debroy *et al.* (1995) descreveram uma OMP de 30 kDa relacionada ao padrão AA em um estudo analisando amostras de EAEC de diversos sorotipos, isoladas de um surto de diarreia na Índia. Anticorpos associados a esta proteína foram capazes de inibir a adesão agregativa destas amostras (DEBROY *et al.*, 1995).

Wai *et al.* (1996) demonstraram a presença de uma OMP de 38 kDa em amostras de EAEC e associaram essa proteína à autoagregação apresentada pelas amostras estudadas.

Chart *et al.* (1995) identificaram uma proteína de membrana externa de 18 kDa em amostras de EAEC dos sorotipos O126:H27 e O44:H18. O papel desta proteína na patogênese não foi totalmente elucidado, entretanto amostras que não secretam essa proteína, não foram capazes de aderir em ensaios de adesão *in vitro* utilizando linhagens celulares.

Nenhuma dessas OMP tiveram seus determinantes genéticos caracterizados. A caracterização completa de uma OMP relacionada ao padrão AA foi realizada por Monteiro-Neto *et al.* (2003) em um estudo com amostras de EAEC do sorotipo

O111:H12. A proteína Ap58, com atividade hemaglutinante e com a capacidade de conferir o padrão AA destas amostras, teve o seu gene identificado no cromossomo e denominado *ap58*. Entretanto a sua presença parece ser restrita ao sorotipo O111:H12 (UBER *et al.*, 2006).

As adesinas bacterianas são sintetizadas no citoplasma bacteriano e necessitam atravessar a membrana citoplasmática e o espaço periplasmático para alcançarem a parede bacteriana, onde serão ancoradas. Para isso dispõem de sistemas bastante especializados de secreção de proteínas (GERLACH; HENSEL, 2007).

1.6 Sistemas de secreção de proteínas bacterianas

A secreção de proteínas é necessária para numerosos aspectos no ciclo de vida das bactérias, como biogênese de organelas, aquisição de nutrientes e expressão de fatores de virulência como toxinas, efetores translocados e adesinas (THANASSI; HULTGREN, 2000; GERLACH; HENSEL, 2007).

A secreção através da membrana externa representa um problema, pois as proteínas, no espaço periplasmático, adquirem nova conformação (como pontes dissulfeto), e na membrana externa não se conhece fonte de energia ou ATP para o sistema (THANASSI; HULTGREN, 2000).

Em bactérias Gram-negativas a classificação dos sistemas de secreção, que pode ser divididos em seis grupos, foi feita de acordo com as características do mecanismo de secreção através da membrana externa (THANASSI; HULTGREN, 2000; GERLACH; HENSEL, 2007). A Figura 1 apresenta um esquema dos cinco principais sistemas de secreção de proteínas bacterianas.

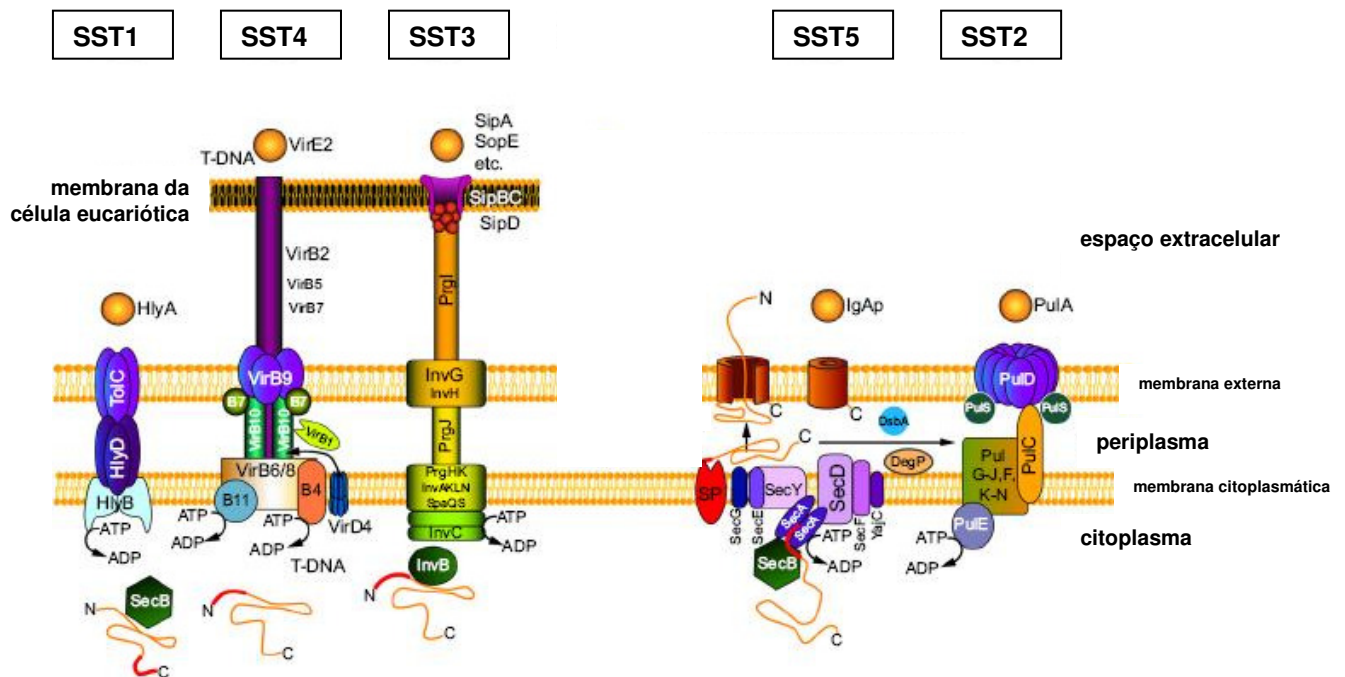


Figura 1 – Representação esquemática dos principais sistemas de secreção de proteínas encontrados em bactérias Gram-negativas: tipo I (SST1), tipo II (SST2), tipo III (SST3), tipo IV (SST4) e tipo V (SST5). Adaptado de Gerlach; Hensel (2007).

O sistema de secreção do tipo I (SST1), também conhecido como sistema *ATP-binding cassette* (ABC) consiste de uma via capaz de secretar proteínas diretamente do citoplasma até a membrana externa, sem necessitar da passagem pelo espaço periplasmático (THANASSI; HULTGREN, 2000; GERLACH; HENSEL, 2007). O aparato de secreção do tipo I é constituído de três proteínas: uma proteína exportadora localizada na membrana interna; uma proteína ancorada na membrana interna que funciona como proteína de fusão de membranas; e uma proteína de membrana externa (THANASSI; HULTGREN, 2000). Durante a secreção, a proteína de fusão de membranas se conecta com ambas as proteínas na membrana interna e externa, formando um canal que secreta a proteína para o espaço extracelular (THANASSI; HULTGREN, 2000). O mecanismo do SST1 foi caracterizado com base na secreção da α -hemolisina, encontrada em algumas amostras de *E. coli* patogênicas (THANABALU *et al.*, 1998).

O sistema de secreção do tipo II (SST2) é um sistema que envolve duas etapas, uma inicial que consiste na passagem através da membrana interna e uma secundária que consiste na passagem através da membrana externa. Na primeira etapa ocorre a participação da Sec translocase, de peptidases, que clivam o

peptídeo sinal das proteínas precursoras durante ou após a translocação através da membrana interna e de uma ATPase (SUGAI; WU, 1992; STATHOPOULOS *et al.*, 2000). A Sec translocase em *E. coli* consiste de uma chaperonina citoplasmática específica (SecB), que leva as proteínas até o maquinário de translocação, além de manter a conformação competente da proteína precursora. A bomba ATPase (SecA) tem papel inicial na translocação, além de interagir com alguns componentes na reação de translocação através da membrana. A segunda etapa ocorre com a participação de um complexo protéico integrado na membrana interna formado por seis proteínas (SecY, SecE, SecD, SecF, SecG e YajC) (STATHOPOULOS *et al.*, 2000; MORI; ITO, 2001). As proteínas integrais SecY, SecE e SecG formam um complexo heterotrimérico, enquanto que as proteínas SecD, SecF e YajC estão organizadas em um complexo distinto que pode estar associado com o complexo SecYEG (DOUNG; WICKNER, 1997). Bactérias da espécie *Klebsiella oxytoca* utilizam o SST2 para efetuar a secreção da lipoproteína pululanase (PUGSLEY *et al.*, 1997).

O sistema de secreção do tipo III (SST3) é um sistema complexo, supramolecular, em que estão envolvidos a membrana interna, o espaço periplasmático, a membrana externa, o espaço extracelular e a membrana da célula hospedeira (GERLACH; HENSEL, 2007). Nesse sistema ocorre a translocação de proteínas bacterianas diretamente no interior da célula eucariótica, as quais são capazes de interferir com as vias de sinalização das células eucarióticas. Esse é um sistema de secreção totalmente dependente do contato bactéria-célula eucariótica. O SST3 é conservado entre diversos os patógenos humanos, tais como *Yersinia* spp., *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, EPEC, EHEC, *Pseudomonas aeruginosa* e *Chlamydia* spp. (HUECK *et al.*, 1998). As proteínas EspA, EspB, EspD, EspF, EspG e Tir, necessárias para a formação da lesão A/E, característica de EPEC e EHEC; são exemplos de proteínas secretadas pelo SST3 (AIZAWA, 2001).

O transporte de proteínas utilizando o sistema de secreção do tipo IV (SST4) é extremamente heterogêneo no que diz respeito ao substrato (proteínas ou complexo proteínas-DNA) e no que diz respeito aos receptores (bactérias, plantas, fungos ou células mamíferas) (BACKERT; SELBACH, 2008). As proteínas necessárias para o SST4 em *Agrobacterium tumefaciens*, o qual é responsável pela transferência de DNA oncogênico para células de plantas, são um complexo

formado por onze proteínas denominadas VirB, as quais podem ser classificadas em três grupos: (i) proteínas que formam o canal intramembrânico (VirB7, 8, 9, 10); (ii) proteínas que fazem parte dos componentes energéticos, (duas ATPase, VirB4-11); (iii) e proteínas componentes que formam o pili (VirB2, 3 e 5). VirD4 é chamada de proteína de junção e classificadas como citoplasmática e de membrana interna (ZHONG *et al.*, 2007; BACKERT; SELBACH, 2008). O mecanismo de secreção é funcionalmente similar ao mecanismo de conjugação de uma grande variedade de plasmídeos em bactérias Gram-negativas (WINANS *et al.*, 1996). Outros patógenos, incluindo *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Brucella spp* e *Helicobacter pylori* utilizam o maquinário do SST4 para exportar proteínas efetoras para o meio extracelular ou para o citoplasma de células eucarióticas (CHRISTIE; VOGEL, 2000).

As proteínas denominadas autotransportadoras são secretadas via aparato de secreção do tipo V (SST5). Essas proteínas apresentam uma seqüência sinal aminoterminal, necessária para atravessar o complexo protéico ancorado na membrana interna do sistema de secreção do tipo II. Apesar das proteínas que necessitam dos sistemas de secreção II e V utilizarem o complexo Sec para atravessarem a membrana interna, eles diferem no modo de atravessar a membrana externa (HENDERSON *et al.*, 2000). As proteínas autotransportadoras possuem um domínio C-terminal que forma o poro através do qual a proteína madura (ou domínio passageiro) irá atravessar a membrana externa da bactéria, por isso a nomenclatura “autotransportadora”. Acredita-se que todos os requerimentos necessários para que a proteína atravesse a membrana externa estejam contidos em uma simples molécula e que a secreção é um processo independente de energia (HENDERSON *et al.*, 2000, HENDERSON; NATARO, 2001). As toxinas Pet e Sat, e as adesinas AIDA-I e TibA; encontradas em algumas amostras de *E. coli* diarreio gênicas são alguns exemplos de proteínas autotransportadoras (HENDERSON *et al.*, 2000).

O tipo VI de secreção (SST6) foi descoberto através de análises *in silico* e foi primeiramente denominado em *Vibrio cholerae* como *virulence associated secretion* (VAS) (PUKATZKI *et al.*, 2006). O cluster de genes altamente conservado entre algumas espécies bacterianas relacionado a esse sistema de secreção não apresenta homologia com os genes dos sistemas anteriormente descritos, por isso foi denominado SST6 (BINGLE *et al.*, 2008). O SST6 secreta uma ou mais proteínas diretamente no citosol da célula alvo eucariótica através do contato célula-célula (PUKATZKI *et al.*, 2006). Os componentes que fazem a passagem da

membrana interna, periplasma e membrana externa permanecem desconhecidos, assim como detalhes da estrutura, localização e função das proteínas que fazem parte do sistema de secreção do tipo VI.

Recentemente foi identificado também através de análises *in silico* um sistema de secreção de proteínas em *Mycobacterium tuberculosis*, o qual foi denominado sistema de secreção do tipo VII (SST7) (ABDALLAH *et al.*, 2007). Da mesma forma que o SST6, detalhes da estrutura, localização e função das proteínas que fazem parte desse sistema não são conhecidos.

1.7 Amostras de EPEC atípica que apresentam adesão agregativa

Amostras de EPEC atípica que apresentam o padrão AA em células HeLa ou HEp-2 já foram descritas por diversos autores (VIEIRA *et al.*, 2001; DULGUER *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004). Entretanto nenhuma adesina mediando esse padrão de adesão nesse subgrupo de EPEC foi caracterizada geneticamente.

Com relação ao padrão AA apresentado pelas amostras do sorotipo O125ac:H6, foi verificado que a temperatura de 18°C inibia a sua expressão e um antissoro produzido contra a amostra protótipo Ec292/84 foi capaz de inibir a adesão das amostras desse sorotipo (BARROS, 2003). Em seguida, nesse mesmo estudo foi obtida uma biblioteca genômica dessa amostra e seis clones que expressavam o padrão AA semelhante à amostra selvagem foram selecionados. Um desses clones (SF141) teve o seu inserto de 1,6 kb seqüenciado sendo identificada uma ORF de 747 pb cuja seqüência predita de aminoácidos apresentava grande identidade com a proteína hipotética YdhF de *E. coli* uropatogênica (WELCH *et al.*, 2002). Ensaio de *immunoblotting* indicaram que essa adesina é uma proteína de membrana externa, entretanto o seqüenciamento aminoterminal dessa proteína foi inconclusivo. Com o intuito de confirmar a participação de YdhF na adesão agregativa, foi construída uma biblioteca de mutantes através da mutagênese com o transposon *Tn_{phoA}* e mutantes que não expressam o padrão AA em células HEp-2 foram selecionados, embora nenhuma caracterização tenha sido realizada com esses mutantes (BARROS, 2003). Desta maneira, este projeto visa dar continuidade aos achados de Barros (2003) na caracterização fenotípica e molecular destes mutantes não

aderentes, objetivando a caracterização molecular da adesina responsável pelo padrão AA das amostras de EPEC atípica do sorotipo O125ac:H6.

5 CONCLUSÃO

- A ausência do gene *secD* no mutante permite formular a hipótese de que adesina que participa da formação do padrão de adesão agregativa seja transportada via Sistema Sec.
- A presença do gene *ydhF* íntegro nos mutantes não descarta sua participação na adesão, e que este gene codifique a adesina que pode ser transportada via Sistema Sec.
- As proteínas de massa molecular de 20, 30 kDa podem estar envolvidos com o padrão AA, padrão este considerado multifatorial para EAEC
- A reatividade do soro com a proteína de massa 30 kDa reforça a ideia da participação desta no padrão de adesão agregativa
- A inibição da adesão com o soro confirma que a proteína não reativa no mutante está envolvida no padrão de adesão agregativa das amostras do sorotipo O125ac:H6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABDALLAH, A. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; CHAMPION, P. A.; COX, J.; LUIRINK, J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; APPELMELK, B. J.; BITTER, W. Type VII secretion: mycobacteria show the way. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 883-891, 2007.

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

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

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

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

ALI, A., MAHMUD, Z. H., MORRIS, G. M., Jr., SOZHAMANNAN, S., JOHNSON, J. A. Sequence analysis of *TnphoA* insertion sites in *Vibrio cholerae* mutants defectiv in rugose polysaccharide production. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6857-6864, 2000.

ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, 5849-5853, 2004.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3396-3999, 2007.

ATZINGEN, M. V.;Barbosa, A. S.; Brito, T.; Vasconcelos, S. A.; Morais, Z. M.; Lima, D. M. C.; Abreu, P. A. E.; Nascimento, A. L. T. O. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol.**, v. 8, p. 1-16, 2008.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.;SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 4800 p.

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

BACKERT, S.; SELBACH, M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Cell Microbiol.**, v. 10, p. 1573-1581, 2008.

BAI, L.; SCHÜLLER, S.; WHALE, A.; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L.; OOKA, T.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; KAPER, J. B.; GOMES, T. A. T.; XU, J.; PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 361-368, 2008.

BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; CANDY, D. C.; MOON, H. W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 2, p. 534-539, 1983.

BARBOSA, A.S.; ABREU, P. A. E.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A Newly Identified Leptospiral Adhesin Mediates Attachment to Laminin. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6356–6364, 2006.

BARROS, S. F. **Caracterização da adesão agregativa de *Escherichia coli* enteropatogênica do sorotipo O125:H6.** Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BARROS, S. F.; ABE, C. M.; ROCHA, S. P. D.; RUIZ, R. M.; BEUTIN, L.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. *Escherichia coli* O125ac:H6 encompasses atypical enteropathogenic *E. coli* spp. that display the aggregative adherence pattern. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 4052-4055, 2008.

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.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LeBOUGUENEC, C. Identification of an aggregative adherence 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.

BEUTIN, L.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Zentralbl. Bakt Hyg. A.**, v. 267, p. 576-88, 1988.

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

BINGLE, L. E.; BAILEY, C. M.; PALLAN, M. J. Type VI secretion: a beginner's guide. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 11, p. 3-8, 2008.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M. P.; VARELA, G.; GADEA, M. P.; SCHELOTTO, F.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children

with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (μB and $\xi\text{R}/\beta\text{2B}$). **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1165-1174, 2006.

BLATTNER F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453-1474, 1997.

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.**, vol. 76, p. 3281-3292, 2008.

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

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

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

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. 102, p. 836-844, 2007.

CAMPOS, L. C.; VIEIRA, M. A.; TRABULSI, L. R.; DA SILVA, L. A.; MONTEIRO-NETO, V.; GOMES, T. A. T. Diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC) strains of fecal origin rarely express F145 adhesins. **Microbiol. Immunol.**, v. 43, p. 167-70, 1999.

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

CARON, E., CREPIN, V. F., SIMPSON, N., KNUTTON, S., GARMENDIA, J., FRANKEL, G. Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. **Curr. Op. Microbiol.**, v. 9, p. 40-45, 2006.

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

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

CHRISTIE, P. J.; VOGEL, J. P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 354-360, 2000.

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

COBELJIC, M.; MILJKOVIC-SELIMOVIC, B.; PAUNOVIC-TODOSIJEVIC, D.; VELICKOVIC, Z.; LEPSANOIC, Z.; ZEC, N.; SAVIC, D.; ILIC, R.; KONSTATINOVIC, S.; JOVANOVIC, B.; KOSTIC, V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhea in neonatal nursery ward. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 1-16, 1996.

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

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.

COOKSON, A. L.; BENNETT, J.; THOMSON-CARTER, F.; ATTWOOD, G. T. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (ehxA) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 73, p. 6360-6369, 2007.

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

CZECZULIN, J.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A. D.; 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.

DALTON, C. B.; MINTZ, E. D.; WELLS, BOPP, C. A.; TAUXE, R. V. Outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in American adults: a clinical and epidemiologic profile. **Epidemiol. Infect.**, v. 123, p. 9-16, 1999.

DEBROY, C.; YEALY, J.; WILSON, R. A.; BAHN, 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.

DONNENBERG, M. S.; CALDERWOOD, S. B.; DONOHUE-ROLFE, A.; KEUSCH, G. T.; KAPER, J. B. Construction and analysis of *TnphoA* mutants of enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEP-2 cells. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 1565-1571, 1990.

DOUNG, F.; WICKNER, W. The SecDFyajC domain of preprotien translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. **EMBO J.**, v 16, p. 4871-4879, 1997.

DUDLEY, E. G.; ABE, C.; GHIGO, J. M.; LATOUR-LAMBERT, P.; HORMAZABAL, C.; NATARO, J. P. An Incl1 plasmid contributes for the adherence of atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cutured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 2012-2114, 2006.

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

DURFEE, T.; NELSON, R.; BALDWIN, S.; PLUNKETT III, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; PETROSINO, J. F.; QIN, X.; MUZNY, D. M.; AYELE, M.; GIBBS, R. A.; CSÖRGO, B.; PÓSFAL, G.; WEINSTOCK, G. M.; BLATTNER, F. R. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 2597–2606, 2008.

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

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

ELLIOT, S. J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 6, p. 196-206, 1995.

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

EWING, W. H.; DAVIS, B. R.; MONTAGNE, T. S. **Studies on the occurrence of *Escherichia coli* serotypes associated wit diarrheal disease.** Atlanta, GA, U. S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Center, 1963.

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

FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHIMIDT, H.; SCHWARZPOF, A.; WIELLER, L. H.; BALJER, G.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and developmente

of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2460-2463, 1994.

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

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V.F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2573-2585, 2005.

GAUTHIER, A.; FINLAY, B. B. Type III secretion system inhibitors are potential antimicrobials. **ASM News**, v. 68, p. 383-387, 2002.

GAUTHIER, A.; PUENTE, J. L.; FINLAY, B. B. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3310-3319, 2003.

GERLACH, R. G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. **Inter. J. Med. Microbiol.**, v. 297, p. 401-415, 2007.

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

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

GOMES, T. A. T.; 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 or without diarrhea in São Paulo. **J. Infect. Dis.**, v. 160, p. 131-135, 1989.

GOMES, T. A. T.; GRIFIN, P. M.; IVEY, C.; TRABULSI, L. R.; RAMOS, S. R. T. S. EPEC infections in urban infants in São Paulo. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 25-33, 1996.

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

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

GUARNER, F. Enteric flora in health and disease. **Digestion**, v. 73, p. 5-12, 2006.

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

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

HENDERSON, I. R.; CAPELLO, R.; NATARO, J. P. Autotransporter proteins, evolution and refining protein secretion. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 529-532, 2000.

HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1231-1243, 2001.

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

HO, T. D.; DAVIS, B. M.; RITCHIE, J. M.; WALDOR, M. K. Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic *Escherichia coli* adherence and intestinal colonization. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 1858-1865, 2008.

HOCHHUT, B., WILDE, C., BALLING, G., MIDDENDORF, B., DOBRINDT, U., BRZUSZKIEWICZ, E., GOTTSCHALK, G., CARNIEL, E. AND HACKER, J. Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 584-595, 2006.

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

IGUCHI, A.; THOMSON, N. R.; OGURA, Y.; SAUNDERS, D.; OOKA, T.; HENDERSON, I. R.; HARRIS, D.; ASADULGHANI, M.; KUROKAWA, K.; DEAN, P.; KENNY, B.; QUAIL, M. A.; THURSTON, S.; DOUGAN, G.; HAYASHI, T.; PARKHILL, J.; FRANKEL, G. Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 Strain E2348/69. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 347-354, 2009.

JENKINS, C.; SMITH, H. R.; LAWSON, A. J.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; WHEELER, J. G.; TOMPKINS, D. S. Serotypes, intimin subtypes, and microbial patterns of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in England from 1993 to 1996. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. D.**, v. 25, p.19-24, 2006.

JIN Q, YUAN ZH, XU JG, WANG Y, SHEN Y, LU WC, WANG JH, LIU H, YANG J, YANG F, QU D, ZHANG XB, ZHANG JY, YANG GW, WU HT, DONG J, SUN LL,

XUE Y, ZHAO AL, GAO YS, ZHU JP, KAN B, CHEN SX, YAO ZJ, HE BK, CHEN RS, MA DL, QIANG BQ, WEN YM, HOU YD, YU J. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 4432-4441, 2002.

JONHSTON, J. W.; MYERS, L. E.; OCHS, M. M.; BENJAMIN, W. H.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K. Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5857-5867, 2004.

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*. **Nature Rev. Microbiol.**, vol. 2, p. 123-138, 2004.

KELLER, R.; ORDOÑEZ, J. G.; DE OLIVEIRA, R. R.; TRABULSI, L. R.; BALDWIN, T. J.; KNUTTON, S. Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2681-2689, 2002.

KHALID, S.; BOND, P. J.; CARPENTER, T.; SANSOM, M. S. P. OmpA: Gating and dynamics via molecular dynamics simulations. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1778, p. 1871-1880, 2007.

KITAGAWA, S. M. S.; TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, L. R.; RAMOS, S. R. T. S.; MURAHOVSKI, J.; FAGUNDES-NETO, U.; CANDEIAS, J. A. N. Etiologia da diarréia infecciosa endêmica da criança de baixo nível sócio-econômico em São Paulo. **Rev. Paul. Pediatr.**, v.7, p. 16-25, 1989.

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

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

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

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

KWON, Y. M.; RICKE, S. C. Efficient amplification of multiple transposon-flanking sequences. **J. Microbiol. Met.**, v. 41, p. 195-199, 2000.

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

LAW, D.; CHART, H. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, p. 685-697, 1998.

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

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

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

MATSUYAMA, S.; FUJITA, Y.; MIZUSHIMA, S. SecD is involved in the release of translocated secretory from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 12, p. 265-270, 1993.

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

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

MOBLEY, H. L. T. & WARREN, J. W.. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, 2216-2217, 1987.

MONTEIRO-NETO, V.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; GIRÓN, J. A. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cel. 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 CG; CARNEIRO SM; NATARO JP; TRABULSI LR; ELIAS WP. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 226, p. 79-85, 2003.

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

MORI, H.; ITO, K. The Sec protein-translocation pathway. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 494-500., 2001.

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

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

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.

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.465-468, 1995.

NATARO, J. P. Molecular diagnosis of EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 54-57, 1996.

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

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

NIE, H.; YANG, F.; ZHANG, X.; YANG, J.; CHEN, L.; WANG, J.; XIONG, Z.; PENG, J.; SUN, L.; DONG, J.; XUE, Y.; XU, X.; CHEN, S.; YAO, Z.; SHEN, Y.; JIN, Q. Complete genome sequence of *Shigella flexneri* 5b and comparison with *Shigella flexneri* 2a. **BMC Genomics**, v. 7, p. 1-9, 2006.

NOUWEN, N.; DRIESSEN, A. J. M. Inactivations of protein translocation by cold-sensitive mutations in the *yajC-secDF* operon. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 6852-6855, 2005.

NUNES, E. B.; SARIDAKIS, H. O.; IRINO, K.; PELAYO, J. S. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 499- 504, 2003.

O'RYAN, M.; PRADO V.; PICKERING, L. K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p. 125-136, 2005.

OLD, D. C.; TAVENDALE, A.; YAKUBU, D. E. Some strains of *Escherichia coli* of putative enteroadherent-aggregative serotypes produce an unusual fibrillar haemagglutinin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 50, p. 87-91, 1989.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, G. F.; MATOS, N. B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P. A.; SILVA, L. H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 507-517, 2006.

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

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K. L.; BENTLEY, S. D.; HOLDEN, M. T.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R. M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T. T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T. S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; O'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18.. **Nature**, v. 413, p. 848-852, 2001.

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

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

PERNA, N. T.; PLUNKETT III, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G. F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; PÓSFAL, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIMK, A.; DIMALANTAK, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D. C.; WELCHI, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, p. 529-533, 2001.

POGLIANO, J. A., BECKWITH, J. SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 13, p. 554-561, 1994.

PRÉRE, M. F.; BACRIE, S. C.; BARON, O.; FAYET, O. Bacterial etiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli*

(EPEC) not belonging to the classical EEC serogroups. **Patologie Biologie**, v. 54, p. 600-602, 2006.

PUGSLEY, A. P.; FRANČETIĆ, O.; POSSOT, O. M.; SAUVONNET, N.; HARDIE, K. R. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria : a review. **Gene**, v. 192, p. 13–19, 1997.

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. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 1528-1533, 2006.

PY, B.; LOISEAU, L.; BARRAS, F. An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. **EMBO Reports**, v. 21, p. 244-248, 2001.

QADRI, F.; HAQUE, A.; FARUQUE, S. M.; BETTELHEIM, K. A.; ROBINS-BROWNE, R.; ALBERT, M. J. Hemagglutinating properties of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 510-514, 1994.

RILEY, L. M.; TEMIS, R. S.; HILGERTSON, 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.; RUSSELL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N. A.; BETTELHEIM, K. A.; FAIRLEY, C. K.; SINCLAIR, M. I.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1797-1805, 2004.

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

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

SAGARA, K.; MATSUYAMA, S.; MIZUSHIMA, S. SecF stabilizes SecD and SecY, components of the protein translocation machinery of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4111-4116, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1659 p.

SÁNCHEZ-SANMARTÍN, C.; BUSTAMANTE, V. H.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-eae operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2823-2833, 2001.

SAVARINO, S. J.; FOX, P.; YIKANG, D.; NATARO, J. P. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4949-4957, 1994.

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

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

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

SCALETISKY, I. C.; MICHALSKI, J.; TORRES, A. G.; DULGUER, M. V.; KAPER, J. B. Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4753-4765, 2005.

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.

SHIN, S.; LU, G.; CAI, M.; KIM, K. *Escherichia coli* outer membrane A adheres to human brain microvascular endothelial cells. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 330, p. 1199-1204, 2005.

SMITH, H.; SCOTLAND, S.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.; ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p.45-9, 1996.

STATHOPOULUS, C.; HENDRIXON, D. R.; THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J.; ST GEME III, J. W.; CURTIS III, R. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1061-1072, 2000.

SUGAI, M.; WU, H. C. Export of the outer membrane lipoprotein is defective in secD, secE and secF mutants of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 2511- 2516, 1992.

SUZART, S.; GOMES T. A. T.; GUTH, B. E. Characterization of serotypes and outer membrane protein profiles in enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Microbiol. Immunol.**, v. 43, p. 201-205, 1999.

TAYLOR, J.; CHARTER, R. E. The isolation of serological types of *Bact coli* in two residential nurseries and their relation to infantile gastroenteritis. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 64, p. 715-728, 1952.

THANABALU, T.; KORONAKIS, E.; HUGHES; C.; KORONAKIS, V. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. **EMBO J**, v. 17, p. 6487–6496, 1998.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, p. 420-430., 2000.

TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4985-4995, 2003.

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

TOWBIM, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

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

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

UBER, A. P.; TRABULSI, L. R.; IRINO, K.; BEUTIN, L.; GHILARDI, A. C.; GOMES, T. A. T.; LIBERATORE, A. M.; DE CASTRO, A. F.; 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.

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

VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R. C.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C. P.; DIAS, A. M. G.; RAMOS, S. R. T. S.; FRANKEL, G.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence

factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 762-772, 2001.

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

VILJANEN, M.; PELTOLA, T.; JUNNILA, S.; OLKKONEN, L.; JARVINEN, H.; KUISTILA, M.; HUOVINEN, P. Outbreak of diarrhoea due *Escherichia coli* O111:B4 in school children and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet**, v. 336, p. 381-384, 1990.

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.

WELCH, R. A.; BURLAND, V.; PLUNKETT, G. D. III; REDFORD, P.; ROESCH, P.; RASKO, D. A.; BUCKLES, E. L.; LIOU, S. R.; BOUTIN, A.; HACKETT, J.; STROUD, D.; MAYHEW, G. F.; ROSE, D. J.; ZHOU, S.; SCHWARTZ, D. C.; PERNA, N. T.; MOBLEY, H. L. T.; DONNENBERG, M. S.; BLATTNER, F. R. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p. 17020-17024, 2002.

WINANS, S. C.; BURNS, D. L.; CHRISTIE, P. J. Adaptation of conjugal transfer for the export of pathogenic macromolecules. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 64-68, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 1987.

YAMAMOTO, T.; KOYAMA, Y.; MATSUMOTO, M.; SONODA, E.; NAKAYAMA, S.; UCHIMURA, M.; PAVEENKITTIPORN, W.; TAMURA, K.; YOKOTA, T.; ECHEVERRIA, P. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v.166, p. 1295-1310, 1992.

YANG, F.; YANG, J.; ZHANG, X.; CHEN, L.; JIANG, Y.; YAN, Y.; TANG, X.; WANG, J.; XIONG, Z.; DONG, J.; XUE, Y.; ZHU, Y.; XU, X.; SUN, L.; CHEN, S.; NIE, H.; PENG, J.; XU, J.; WANG, Y.; YUAN, Z.; WEN, Y.; YAO, Z.; SHEN, Y.; QIANG, B.; HOU, Y.; YU, J.; JIN, Q. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. 6445-6458, 2005.

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

ZHONG, Q.; SHAO, S. H.; CUI, L. L.; MU, R. H.; JU, X. L.; DONG, S. R. Type IV secretion system in *Helicobacter pylori*: a new insight into pathogenicity. **Chin. Med. J.**, v. 120, p. 2138-42, 2007.