



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

André Victor Barbosa

Potencial patogênico de cepas de *Escherichia coli* Enteropatogênicas atípicas (aEPEC) isoladas de cães e humanos com sintomas de diarreia

Rio de Janeiro

2018

André Victor Barbosa

**Potencial patogênico de cepas de *Escherichia coli* Enteropatogênicas atípicas (aEPEC)
isoladas de cães e humanos com sintomas de diarreia**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador: Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B238 Barbosa, André Victor.

Potencial patogênico de cepas de *Escherichia coli* Enteropatogênicas atípicas (aEPEC) isoladas de cães e humanos com sintomas de diarreia/ André Victor Barbosa. -2018.
98f.

Orientador: João Ramos Costa Andrade.

Coorientador: Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Escherichia coli* - Teses. 2. Diarreia - Teses. 3. Virulência (Microbiologia) - Teses. 4. Zoonoses - Teses. 5. Cães – Teses. I. Andrade, João Ramos Costa. II. Cerqueira, Aloysio de Mello Figueiredo. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

André Victor Barbosa

**Potencial patogênico de cepas de *Escherichia coli* Enteropatogênicas atípicas (aEPEC)
isoladas de cães e humanos com sintomas de diarreia**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 25 de setembro de 2018.

Coorientador: Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira
Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^a. Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^a. Dra. Angela Correa de Freitas
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^a. Dra. Alice Gonçalves Martins Gonzalez
Universidade Federal Fluminense

Dra. Deyse Christina Vallim da Silva
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça diária da saúde e por iluminar minha mente, coração e espírito durante esta caminhada.

Aos meus orientadores João Ramos da Costa Andrade e Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira, pela amizade, oportunidade, ensinamento e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao curso de pós-graduação em Microbiologia na figura da sua coordenação, docentes e discentes, sempre dispostos a ajudar.

A Universidade Federal Fluminense, minha casa, pela estrutura, apoio e confiança na minha formação, em especial os colegas e professores Felipe Piedade, Otílio Machado, Rita Cubel, Júlia Peixoto e Márcia Soares.

Aos órgãos de fomento, Faperj e CNPq, que mesmo em um momento preocupante para o desenvolvimento da ciência e da educação em nosso país, auxiliam os heroicos professores e alunos nesta empreitada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Sub-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa (SR-2/UERJ), por todo o apoio à pós-graduação em nosso país.

A minha esposa amada Clarissa Werneck, companheira da vida e da ciência, por seu amor, suporte em um período especial de nossas vidas e apoio incondicional sempre.

A nossa filha Elis, pela inspiração diária e por cada sorriso após um dia de trabalho.

Aos meus pais, Flávio e Marta, pelo amor, apoio e toda dedicação na impoluta formação do meu caráter. Além da inspiração e exemplo na luta por uma sociedade mais justa e humanitária

A toda minha família, em especial as minhas amadas avós Cici e Isa, queridos irmãos Felipe e Mariana, sogra e amiga Adriane e cunhados Livia e Rafael.

Aos companheiros de laboratório: Lavicie Araís, Gillian Rocha, Daniel Campelo, Leandro Simões e demais amigos da UFF; Esther Helena, Thays Araújo, Raquel Costa e demais amigos da UERJ; Deyse Vallim, Leonardo Rusak e demais amigos da Fiocruz.

Enfim, a todos que conviveram comigo nestes últimos anos e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Quando reconhecemos nosso lugar na imensidão de anos-luz e no transcorrer das eras, quando compreendemos a complexidade, a beleza e a sutileza da vida, então o sentimento sublime, misto de júbilo e humildade, é certamente espiritual.

Carl Edward Sagan

RESUMO

BARBOSA, André Victor. **Potencial patogênico de cepas de *Escherichia coli* Enteropatogênicas atípicas (aEPEC) isoladas de cães e humanos com sintomas de diarreia.** 2018. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Nas últimas décadas cepas de *Escherichia coli* Enteropatogênica atípicas (aEPEC) emergiram como um importante patógeno associado à diarreia infantil no mundo, cenário compartilhado pelo Brasil. aEPEC são comumente encontradas em diferentes espécies animais, incluindo animais de companhia como os cães, onde frequentemente compartilham do mesmo sorotipo, genes de virulência e apresentam alta similaridade genética com cepas humanas. Embora haja o risco, o papel de aEPEC como agente zoonótico ainda não está bem definido. No presente trabalho, um grupo de cepas aEPEC (n=5) dos sorotipos O4:H16, O11:H16, O49:H10 e O51:H40 (2), isoladas de cães filhotes com diarreia foi comparado com outro grupo de cepas dos mesmos sorotipos (n=5), isoladas de casos de diarreia infantil no Brasil, quanto às características genotípicas e fenotípicas de virulência, procurando descrever similaridades que sustentem a capacidade patogênica destas cepas quando transmitidas ao homem. Para tal, foram avaliadas: i) a presença de fatores associados à virulência por PCR (genes *ecpA*, *hcpA*, *iha*, *paa*, *csgAB*, *saa*, *pilS*, *toxB*, *ehxA*, *espP* e 16 genes *nle*) e testes fenotípicos (expressão de fímbrias Curli e T1F), ii) a relação filogenética e a clonalidade entre as cepas por MLST e PFGE, e iii) a capacidade de aderir, invadir e sobreviver em células intestinais humanas por meio de ensaios “*in vitro*”. A ocorrência de genes de virulência foi similar entre as cepas caninas e humanas, onde os genes *ecpA*, *csgAB* e *hcpA* foram encontrados na maioria das cepas, enquanto *efa-1* e *toxB* foram apenas observados nos sorotipos O4:H16 e O49:H10, respectivamente. As cepas de igual sorotipo apresentaram um perfil similar de genes *nle*, com os genes *nleB*, *nleE* ocorrendo nas cepas dos sorotipos O4:H16 e O51:H40. Os STs 10 (sorotipos O4:H16, O11:H16 e O51:H40) e 206 (O49:H10) foram identificados entre as cepas, onde, após análise por PFGE, o dendograma demonstrou o agrupamento entre as cepas de igual ST e sorotipo, embora sem a ocorrência de clones entre as cepas caninas e humanas. As cepas de ambas as origens apresentaram o fenótipo de aderência LAL em células HEp-2, Caco-2 e T84. Além disso, todas demonstraram a capacidade de invadir e sobreviver por ao menos 48 horas em monocamadas polarizadas da linhagem intestinal humana T84. Em suma, estes achados indicam que cães filhotes carregam cepas aEPEC potencialmente patogênicas ao homem, que em condições higiênico-sanitárias não adequadas, podem ser transmitidas a uma população susceptível, principalmente crianças com menos de 2 anos, e estabelecer um quadro infeccioso de diarreia.

Palavras-chave: *Escherichia coli* Enteropatogênicas atípicas. Virulência. Cães. Zoonose.

ABSTRACT

BARBOSA, André Victor. **Pathogenic potential of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains (aEPEC) isolated from dogs and children with diarrhea signs**. 2018. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

In recent decades, atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains have emerged as an important pathogen associated with childhood diarrhea around the world, including Brazil. aEPEC are commonly found in different animal species, including companion animals such as dogs, where some strains share the same serotype, virulence genes, and exhibit a genetic correlation with human strains. Although, the role of aEPEC as a zoonotic agent is not yet fully elucidated. In the present study, the genotypic and phenotypic characteristics of virulence was evaluated among two groups of aEPEC strains of the O4:H16, O11: H16, O49: H10 and O51: H40 (2) serotypes, isolated from puppies with diarrhea (n = 5) and from cases of childhood diarrhea in Brazil (n = 5), in order to determine the pathogenic capacity of these strains when transmitted to humans. We evaluated: (i) the presence of virulence factors by PCR (*ecpA*, *hcpA*, *iha*, *paa*, *csgAB*, *saa*, *pilS*, *toxB*, *ehxA*, *espP* and 16 *nle* genes) and phenotypic tests (expression of curli and T1F fimbrias); (ii) the phylogenetic relationship and the clonality between the strains by MLST and PFGE; (iii) the ability to adhere, invade and survive inside the intestinal cells by “*in vitro*” assays. The occurrence of virulence genes was similar between canine and human strains and the *ecpA*, *csgAB* and *hcpA* genes were found in most strains, whereas *efa-1* and *toxB* occurred only in O4: H16 and O49: H10 serotypes, respectively. Strains of the same serotype showed a similar *nle* genes profile, with the presence of *nleB* and *nleE* genes in O4:H16 and O51:H40 serotypes. The STs 10 (serotypes O4: H16, O11: H16 and O51: H40) and 206 (O49: H10) were identified and the PFGE dendrogram showed clustering between strains of the same ST and serotype, although the occurrence of clones among the canine and human isolates was not observed. Strains of both origins showed the LAL adhesion phenotype in HEp-2, Caco-2 and T84 cells. In addition, all strains demonstrated the ability to invade and survive for at least 48 hours in polarized monolayers of the T84 human intestinal lineage. To date, these findings indicate that puppies carry aEPEC strains potentially pathogenic to humans, which in a poor hygiene environment, can be transmitted to a susceptible population, especially children under 2 years of age, leading to diarrheal disease.

Keywords: Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. Virulence. Dogs. Zoonosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Análise prévia das cepas aEPEC caninas e humanas realizada por Almeida *et al.* (2012) e Arais (2010): sorotipagem, ocorrência e caracterização de genes de virulência, similiaridade genética e fenótipo de aderência em células Caco-2 após 3 horas de interação 36
- Figura 2 – Relação filogenética entre os “*sequence types*” 10 e 206, identificados nas cepas aEPEC humanas e caninas no presente estudo, e outros STs comuns aos patotipos EHEC/STEC e tEPEC. A árvore filogenética foi construída pelo método “*Neighbor-joining*”, baseado no modelo “*maximum composite likelihood*”, com 1.000 replicas de “*Bootstrap*” 55
- Figura 3 – Análise da similaridade genética por meio do perfil de macrorrestrição (PFGE) associada às características antigênicas e filogenéticas das cepas caninas e humanas de aEPEC. O dendograma foi construído utilizando o software GelJ, pelo método UPGMA com coeficiente de Dice e índice de tolerância de 1.5..... 57
- Figura 4 – Imagens representativas, após coloração das células por solução de Giemsa, do fenótipo de aderência em células das linhagens HEp-2 e T84 após 6 horas de incubação: LAL, cepas aEPEC 2.3 e H1 (O51:H40), e LA, cepa tEPEC 2348/69 (O127:H6) 58
- Figura 5 – Imagem superposta (*merging*) de microscopia de fase e dupla imunofluorescência com células Caco-2 não confluentes infectadas pelas cepas 2.3 (A), 21 (B) e H1 (C) do sorotipo O51:H40, após 3 horas de interação. As bactérias foram tratadas com anticorpo (coelho) contra o antígeno O51, antes e após a permeabilização das células com Triton X-100. Usamos anticorpo secundário anti-IgG de coelho-Alexa 594 (vermelho) para marcar as bactérias extracelulares e anti-IgG-Alexa 488 (verde) para as bactérias intracelulares. Estas aparecem marcadas em verde e as extracelulares em laranja (verde+vermelho). 1000 x..... 70
- Figura 6 – Imagem superposta (*merging*) de microscopia de fase e dupla imunofluorescência com células T84 não confluentes infectadas pelas cepas 2.3 (A), 21 (B) e H1 (C) do sorotipo O51:H40, após 3 horas de interação.

As bactérias foram tratadas com anticorpo (coelho) contra o antígeno O51, antes e após a permeabilização das células com Triton X-100. Usamos anticorpo secundário anti-IgG de coelho-Alexa 594 (vermelho) para marcar as bactérias extracelulares e anti-IgG-Alexa 488 (verde) para as bactérias intracelulares. Estas aparecem marcadas em verde e as extracelulares em laranja (verde+vermelho). 1000 x..... 71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Relação das cepas de aEPEC utilizadas neste estudo.....	33
Quadro 2 –	Descrição dos iniciadores utilizados neste estudo nos ensaios de PCR.....	38-40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Relação entre a população total associada ao tapete e a população intracelular nas cepas H1, 2.3 e 21 (O51:H40) após 3 horas de interação com tapetes polarizados das linhagens Caco-2 e T84.....	61
Gráfico 2 –	Total de bactérias associadas (população extra e intracelular) em tapetes polarizados (10-12 dias) da linhagem celular T84 após 3 horas de interação.....	63
Gráfico 3 –	Média do índice de invasão (%) apresentado pelas cepas aEPEC após três ensaios independentes, com 3 horas de interação, em tapetes polarizados da linhagem T84.	63
Gráfico 4 –	Variação da população intracelular após os períodos de interação de 2h, 24h e 48h com tapetes polarizados da linhagem T84 nas cepas humanas e caninas do sorotipo O4:H16.....	65
Gráfico 5 –	Variação da população intracelular após os períodos de interação de 2h, 24h e 48h com tapetes polarizados da linhagem T84 nas cepas humanas e caninas do sorotipo O11:H16.....	66
Gráfico 6 –	Variação da população intracelular após os períodos de interação de 2h, 24h e 48h com tapetes polarizados da linhagem T84 nas cepas humanas e caninas do sorotipo O49:H10.....	67
Gráfico 7 –	Variação da população intracelular após os períodos de interação de 2h, 24h e 48h com tapetes polarizados da linhagem T84 nas cepas humanas e caninas do sorotipo O51:H40.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Ocorrência dos marcadores de virulência, expressão de adesinas e fermentação do sorbitol em cepas aEPEC de origem canina e humana.....	53
Tabela 2 –	Ocorrência e distribuição de genes <i>nle</i> (non-LEE-encoded effectors) por ilha de patogenicidade (PAI) em cepas aEPEC de origem canina e humana.....	54
Tabela 3 –	Avaliação quantitativa da associação e invasão celular pelas cepas H1, 2.3 e 21 (sorotipo O51:H40) em ensaios com tapetes não confluentes e polarizados das linhagens intestinais Caco-2 e T84.....	60
Tabela 4 –	Variação do percental de invasão entre as cepas caninas de humanas dos sorotipos O4:H16, O11:H16, O49:H10 e O51:H40.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E	<i>Attaching and effacing lesion</i>
AA	Aderência agregativa
aEPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica atípicas
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AIEC	<i>E. coli</i> aderente-invasora
APEC	<i>E. coli</i> patogênica de aves
BFP	<i>Bundle-forming pili</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CHEF	<i>Contour-clamped homogeneous electric field</i>
CRA	<i>Congo red agar</i>
D.O.	Densidade ótica
DA	Aderência difusa
DAEC	<i>E. coli</i> de aderência difusa
DEC	<i>E. coli</i> diarreiogênica
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EDTA	Ácido etilenodiamino tretra-acético
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ERIC PCR	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR</i>
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
FAS	<i>Fluorescent actin staining</i>
G-C	Ligação guanina com citosina no DNA
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazine metanosulfonil
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HUS	<i>Uremic-hemolytic syndrome</i>
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i>

IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina 8
IVOC	<i>in vitro organ culture</i>
LA	Aderência localizada
LAL	Aderência localizada “ <i>like</i> ”
LB	Luria Bertani
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
MatB	<i>Meningitis-associated and temperature-regulated (Mat) fimbriae</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MRA	<i>Molecular risk assessment</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NGS	<i>New generation sequencing</i>
NLE	<i>Non-LEE effectors</i>
NMEC	<i>E. coli</i> associada à meningite neonatal
OF	Oxidação e fermentação
PAI	<i>Pathogenicity island</i>
PBS	<i>Phosphate buffer</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pEAF	<i>EPEC adherence fator</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RAPD	<i>Randon Amplified Polymorphic DNA</i>
RPM	Rotações por minuto
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i> e
SePEC	<i>E. coli</i> septicêmica
SFB	Soro fetal bovino
SI	Sistema imune
ST	<i>Sequence type</i>
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
T1F	<i>Type 1 fimbriae</i>
T3SS	<i>Type 3 secretion system</i>
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TE	Tampão tris-EDTA

TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TSA	<i>Tripticasein soy agar</i>
TSB	<i>Tripticasein soy broth</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
Unicef	<i>United Nations Children's Fund</i>
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
UV	Radiação ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
cm ²	Centímetro quadrado
g	Grama
Kb	Kilo pares de base
KDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampère
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
U	Unidade
V	Volts
σ	Desvio padrão
h	Hora(s)
m	Minuto(s)
s	Segundo(s)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	18
1	OBJETIVOS	32
1.1	Geral	32
1.2	Específicos	32
2	METODOLOGIA	33
2.1	Cepas bacterianas.....	33
2.1.1	<u>Caracterização prévia das cepas.....</u>	34
2.2	Investigação de marcadores adicionais de virulência.....	34
2.3	Ensaio fenotípicos “<i>in vitro</i>” de observação da expressão de fimbria Curli, fimbria do tipo I (T1F) e da fermentação do sorbitol.....	37
2.4	Avaliação filogenética por meio da técnica de “<i>multi-locus sequence type</i>” (MLST).....	41
2.5	Avaliação da similaridade genética através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	42
2.6	Linhagens celulares empregadas e condições de cultivo das células.....	44
2.6.1	<u>Linhagens celulares.....</u>	44
2.6.2	<u>Cultivo das linhagens celulares.....</u>	44
2.6.3	<u>Preparo dos tapetes celulares para os testes de aderência e de invasão.....</u>	45
2.7	Fenótipo de aderência nas linhagens celulares HEp-2 e T84.....	45
2.8	Ensaio quantitativos de invasão em células das linhagens Caco-2 e T84.....	46
2.9	Ensaio de determinação dos índices de persistência (sobrevivência) intracelular em células da linhagem T84.....	47
2.10	Microscopia de imunofluorescência com marcação diferencial entre as populações intracelulares e extracelulares após interação com tapetes da linhagem T84.....	49
2.11	Análise gráfica e estatística sobre os ensaios de invasão com as linhagens Caco-2 e T84 e ensaios de persistência em células T84.....	50
3	RESULTADOS.....	52
3.1	Avaliação da presença dos genes de virulência por PCR e da expressão das fímbrias Curli e T1F.....	52

3.2	Análise por “<i>multi-locus sequence type</i>” (MLST).....	55
3.3	Caracterização do perfil de macrorrestrição por PFGE.....	56
3.4	Fenótipo de aderência nas linhagens celulares HEp-2 e T84.....	58
3.5	Avaliação comparativa da invasão celular em tapetes não confluentes e polarizados das linhagens Caco-2 e T84 com as cepas 2.3, 21 e H1 do sorotipo O51:H40.....	59
3.6	Determinação do percentual de invasão celular por cepas aEPEC caninas e humanas em tapetes polarizados da linhagem T84 após 3 horas de interação.....	62
3.7	Avaliação da sobrevivência e multiplicação intracelular em tapetes polarizados da linhagem T84 após 48 horas de interação	64
3.8	Observação da invasão por microscopia de imunofluorescência.....	69
4	DISCUSSÃO.....	72
	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84

INTRODUÇÃO

O gênero *Escherichia* é composto por bastonetes retos, medindo entre $1,1-1,5 \times 2,0-6,0\mu\text{m}$, Gram-negativos, pertencentes a Família Enterobacteriaceae (Divisão Eubacteria; Filo Proteobacteria; Classe Gammaproteobacteria; Ordem Enterobacteriales) (Imhoff, 2005). Podem ser móveis por meio de flagelos peritríqueos ou imóveis, oxidase negativa, aeróbicos ou anaeróbios facultativos, apresentando tanto a respiração como a fermentação como via metabólica. Produzem ácido e gás a partir da fermentação de muitos carboidratos. A lactose é fermentada pela maioria das cepas da espécie *Escherichia coli*, porém a fermentação pode ser lenta ou ausente em outras espécies. Normalmente não produzem H_2S . O percentual de G-C no genoma varia entre 48-59% (Scheutz & Strockbine, 2015).

E. coli foi primeiramente isolada das fezes de uma criança em 1885, pelo pediatra alemão Theodor Escherich (Escherich, 1885). Até o momento, além de *E. coli*, outras sete espécies ocorrem dentro do gênero: *E. albertii*, *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. marmotae* e *E. vulneris* (www.bacterio.net/escherichia.html; acessado em 31/08/2018). Entretanto, a classificação filogenética do gênero *Escherichia* tem sido alvo de estudos (Walk et al., 2009, Gangiredla et al., 2018). Recentemente alguns autores propuseram a reclassificação das espécies *E. hermannii* e *E. vulneris* para os gêneros *Atlantibacter* (*A. hermannii*) e *Pseudoescherichia* (*P. vulneris*), respectivamente (Alnajjar & Gupta, 2017; Hata et al., 2016). Além disso, embora os gêneros *Escherichia* e *Shigella* sejam historicamente separados dentro da família *Enterobacteriaceae*, análises de DNA genômico revelaram um alto grau de similaridade, sugerindo que os membros do gênero *Shigella* divergiram diretamente de uma linhagem de *E. coli*, compreendendo uma mesma espécie. No entanto, ainda hoje os dois microrganismos continuam a ser tratados como gêneros diferentes, pautando-se na percepção histórica de suas patologia e ecologia (Scheutz & Strockbine, 2015).

E. coli é comumente encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais, onde, na maioria das vezes, mantêm uma relação benéfica com seu hospedeiro. A maioria das cepas são comensais e raramente estão envolvidas com alguma doença, exceto em situações extremas, como em indivíduos imunodeprimidos ou quando há uma lesão grave na barreira gastrointestinal, como em casos de peritonite. O habitat natural destes microrganismos é a mucosa colônica, onde figuram como o anaeróbio facultativo mais abundante (Kaper et al.,

2004).

Mais de meio século após a descrição da espécie, o caráter comensal/oportunista conferido à *E. coli* se manteve hegemônico. Essa visão foi mudando progressivamente ao longo dos anos com o acúmulo de evidências indicativas da capacidade patogênica intrínseca de algumas cepas, até que, os trabalhos pioneiros de Bray (1945) e Bray & Beavan (1948) no Reino Unido, utilizando anticorpos para identificar e diferenciar cepas de *E. coli* patogênicas nas fezes de indivíduos doentes, levaram ao reconhecimento desta bactéria como agente etiológico de diarreia em recém-nascidos (Bay, 1945 apud Chen & Frankel, 2005; Bray & Beavan, 1948 apud Chen & Frankel, 2005). Nos anos que se seguiram, vários surtos de gastroenterite infantil foram associados à *E. coli*, consolidando estas cepas como patógenos intestinais (Chen & Frankel, 2005).

Hoje, sabe-se, existem linhagens de *E. coli* que, por meio da aquisição de elementos genéticos específicos, apresentam um variado comportamento patogênico, além da capacidade de ocupar novos nichos, rompendo a homeostase do hospedeiro e ocasionando um amplo espectro de doenças (Kaper *et al.*, 2004). Certas combinações de genes de virulência caracterizam determinados grupos, conferindo-lhes a capacidade de causar doença em indivíduos saudáveis, ocasionando, principalmente em humanos, três síndromes clínicas distintas: doença entérica/intestinal, infecções do trato urinário ou sepse/meningite (Kaper *et al.*, 2004).

As cepas patogênicas de *E. coli* foram primeiramente classificadas de acordo com a síndrome clínica que desenvolvem: *E. coli* diarreiogênicas (DEC), *E. coli* uropatogênicas (UPEC), *E. coli* septicêmicas (SEPEC), *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC); ou algumas vezes de acordo com o hospedeiro alvo, como *E. coli* patogênica para aves (APEC) (Mainil, 2013). No entanto, a crescente descoberta das bases genéticas da virulência em *E. coli* permitiu a classificação em diversos “patotipos”, ou seja, cepas que compartilham marcadores genéticos de virulência relacionados ao mesmo processo de agressão ao hospedeiro (Kaper *et al.*, 2004).

Em se tratando das cepas DEC, podemos citar: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), produtora de enterotoxinas que levam a hipersecreção de eletrólitos e água pelos enterócitos de animais, incluindo humanos; *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC/*Shigella*), capaz de invadir enterócitos de humanos e outros primatas; *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), Enteroagregativa (EAEC) e Difusamente Aderida (DAEC), aderem aos enterócitos apresentando padrões variados, interferindo na sua funcionalidade; *E. coli* produtora de Toxina Shiga (STEC), onde

se enquadram as cepas Enterohemorrágicas (EHEC), associadas a surtos e casos esporádicos de diarreia, colite hemorrágica ou até mesmo complicações graves como a síndrome urêmico-hemolítica (HUS). Embora não relacionado com diarreia, outro patotipo intestinal de *E. coli* são as Aderente-Invasivas (AIEC), associadas a doença inflamatória intestinal (IBD), como a colite ulcerativa e a doença de Crohn (Kaper *et al.*, 2004; Palmela *et al.*, 2017).

Além destes, um provável novo patotipo foi responsável por um grande surto ocorrido na Europa em 2011. O surto foi causado por um clone hipervirulento do sorotipo O104:H4 muito similar ao patotipo EAEC, porém carreando o prófago que codifica a toxina de Shiga, ocasionando um total de 46 óbitos, com 3.128 casos de gastroenterite aguda e 782 casos de HUS (Navarro-Garcia, 2014).

O termo “*Escherichia coli* Enteropatogênica” (EPEC) foi proposto em 1955 por Neter *et al.* a fim de descrever cepas potencialmente patogênicas, raramente encontradas em fezes de indivíduos saudáveis; sendo este o primeiro patotipo descrito. Cepas de EPEC comumente pertencem à 7 sorogrupos baseados nos antígenos somáticos: O55, O86, O88, O111, O114, O119, O127 e O142, também conhecidos como “sorogrupos clássicos” (Gomes *et al.*, 2016). Embora o sorogrupo, a relação com doença diarreica e a epidemiologia sejam importantes características na identificação de uma cepa de EPEC, a característica mais marcante deste patotipo é a capacidade de produzir uma lesão histopatológica conhecida como “*Attaching and Effacing*” (A/E), caracterizada pela desestruturação (achatamento) das microvilosidades intestinais e pela aderência íntima da bactéria à superfície do enterócito (Hu & Torres, 2015). Em síntese, as EPEC são definidas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) que possuem a habilidade de produzir lesão A/E (característica também compartilhada com o patotipo EHEC e com o patógeno *Citrobacter rodentium*) mas não carregam os genes que codificam a toxina Shiga (*stx*) (Hu & Torres, 2015).

A lesão A/E, primeiramente descrita por Moon *et al.* (1983), é resultado de uma extensa desorganização dos filamentos de actina do citoesqueleto da célula eucariótica, seguida da reorganização destes filamentos no entorno da superfície basal da bactéria, formando uma estrutura conhecida como pedestal. Os principais genes envolvidos neste processo estão localizados em uma grande região no cromossomo de 35,6 Kb, uma ilha de patogenicidade (PAI) chamada de “*Locus of Enterocyte Effacement*” (LEE), composta de 41 genes organizados em cinco operons, os quais compreendem genes reguladores, o gene da proteína de superfície íntima, genes envolvidos na síntese de um sistema de secreção do tipo III (T3SS), genes codificantes de chaperonas e várias outras proteínas secretadas, incluindo

moléculas efetoras e o receptor translocado da intimina, Tir (Franzin & Sircili, 2015; Ingle *et al.*, 2016; Mainil, 2013).

A intimina, codificada pelo gene *eae*, é uma proteína de superfície (Omp) de 94KDa que promove a adesão entre a bactéria e enterócito na lesão A/E, estimula uma resposta imune do tipo T_H1 e hiperplasia da cripta intestinal (Kaper *et al.*, 2004). O T3SS, por meio das proteínas secretadas EspA, EspB e EspD, forma um poro na membrana eucariótica permitindo a injeção de proteínas e moléculas efetoras dentro do citoplasma hospedeiro. Uma destas proteínas efetoras, conhecida como Tir (“*Translocated Intimin Receptor*”), é inserida na membrana da célula hospedeira, onde desempenha o papel de receptor para intimina, permitindo a adesão íntima da bactéria ao enterócito (Kaper *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2011).

Em adição às moléculas efetoras codificadas na região LEE, foram descritos vários efetores “não-LEE” (Nle), localizados em pelo menos outras seis PAIs ou em prófagos (ex.: *cif*, *espI/nleA*, *nleB*, *nleC*, *nleD*, *nleE* e *nleH*). Ainda sendo alvo de estudos, as proteínas Nle parecem possuir papel nos processos de desestruturação do citoesqueleto e das junções de oclusão da célula hospedeira, além da modulação da resposta inflamatória, incluindo a inibição de apoptose e da sinalização via NF- κ B (Gomes *et al.*, 2016; Ingle *et al.*, 2016). A presença destes genes é vista como um indicador de patogenicidade, uma vez que está associada às cepas diarreio gênicas (Coombes *et al.*, 2008).

Resumidamente, após entrar no trato gastrointestinal as EPEC: (i) aderem inicialmente a mucosa dos intestinos delgado e grosso, com o auxílio de diversas estruturas de superfície, como o flagelo (Sampaio *et al.*, 2009) e fímbrias (Hernandes *et al.*, 2011), que interagem com o enterócito e/ou matriz extracelular; (ii) expressam o T3SS por onde injetam diversas moléculas efetoras na célula hospedeira; (iii) aderem intimamente com o enterócito através da ligação intimina-Tir, onde há a formação das estruturas em pedestal e apagamento das microvilosidades. Todo este processo resulta na diminuição da superfície de absorção e alteração do fluxo de íons e água, levando ao quadro de diarreia (Hodges & Gill, 2010).

Em 1995, foi proposta a divisão de EPEC em dois grupos, denominados EPEC típicas (tEPEC) e EPEC atípicas (aEPEC) (Kaper, 1996). De uma forma prática, a diferença entre estes dois grupos se dá pela presença de um plasmídeo chamado “*EPEC Adherence Factor*” (pEAF) nas cepas de tEPEC, em contraste com a ausência nas cepas atípicas. A presença deste plasmídeo foi observada na cepa E2348/69 (O127:H6) e relacionada com um padrão característico de aderência em células da linhagem HEp-2, chamado de “aderência localizada” (LA) (Baldini *et al.*, 1983).

Este padrão de aderência é caracterizado pela formação de aglomerados de bactérias na superfície da célula hospedeira por meio da expressão de uma fímbria do tipo IV, chamada “*Bundle-Forming Pili*” (BFP), cujos genes estão organizados em um operon dentro do pEAF. O BFP se projeta da bactéria, unindo-a ao enterócito e a outras células bacterianas, formando uma estrutura tridimensional conhecida como microcolônia (Nougayrède *et al.*, 2003). Em contrapartida, cepas de aEPEC podem apresentar diferentes padrões de aderência em cultura de células epiteliais, conhecidos como: “*Localized Adherence-like*” (LAL), onde se observa uma estrutura semelhante a microcolônia da LA, porém de forma mais frouxa; “aderência difusa” (DA), onde há a adesão das bactérias por toda a superfície da célula; e “aderência agregativa” (AA), que se caracteriza pelo arranjo das bactérias em “tijolos empilhados” na superfície da célula (Scaletsky *et al.*, 2010).

tEPEC aparentam ser mais homogêneas quanto aos seus fatores de virulência, basicamente relacionados, na maioria das cepas, ao locus LEE e ao plasmídeo pEAF. Por outro lado, as cepas atípicas compreendem um grupo altamente heterogêneo, onde são observados diferentes repertórios de virulência comumente associados a outros patótipos, como STEC e EAEC (Gomes *et al.*, 2011; Hernandez *et al.*, 2009). Embora a fímbria BFP das tEPEC auxilie na interação com a célula hospedeira, esta não parece ser essencial para ocasionar doença em humanos, uma vez que cepas aEPEC são comumente associadas a casos esporádicos e surtos de diarreia. Sabe-se que várias outras adesinas (Paa, LpfAO113, Iha, Ehx, ToxB, LdaG) podem ocorrer em cepas de aEPEC onde desempenhariam papel semelhante à BFP no processo de colonização e doença (Bardiau *et al.*, 2010).

Como dito, além dos fatores de virulência associados ao locus LEE e ao T3SS, outros fatores, como adesinas e toxinas, também descritos em outros patótipos, ocorrem frequentemente em cepas aEPEC, onde podem, em conjunto, auxiliar nos processos de colonização e infecção do hospedeiro (Gomes *et al.*, 2011; Hernandez *et al.*, 2011)

Os genes *espP*, *ehxA* e *toxB* são associados a um plasmídeo de alto peso (92-104 kb) descrito em cepas do sorotipo O157:H7, conhecido como pO157. O gene *espP* codifica uma serina-protease conhecida por clivar a pepsina A e o fator V da coagulação; *ehxA*, encontrado no operon *ehxCABD*, codifica a subunidade principal de uma hemolisina; e *toxB*, por sua vez, codifica uma proteína que contribui para o aumento da secreção de moléculas via o T3SS (Lim *et al.*, 2010). Já os genes *saa* e *pilS* estão associados a um plasmídeo descrito inicialmente em cepas STEC LEE negativas do sorotipo O113:H21 associadas a HUS (denominado pO113). O gene *saa* codifica uma adesina autoaglutinante, designada Saa (STEC

autoagglutinating adhesin), enquanto que *pilS*, codifica a subunidade principal de um pilus do tipo IV (Paton *et al.*, 2001; Srimanote *et al.*, 2002).

Outros genes comumente encontrados no cromossomo de cepas EHEC, como o gene *iha* (adesina homóloga a IrgA de *Vibrio cholerae*), *paa* (adesina “*Porcine Attaching and Effacing-associated*” [Paa], um tipo de intimina associada à infecção em suínos), e *hcpA* (subunidade principal do pili HCP [“*Hemorrhagic Coli Pilus*”]), um pili do tipo IV associado à aderência intestinal em humanos e bovinos), também já foram observados em cepas aEPEC (Gomes *et al.*, 2011; Mcwilliams & Torres, 2014; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2007). Além destes genes, o gene *lifA/efa-1* (*lymphocyte inhibitory factor A/EHEC factor for adherence-1*), presente na ilha de patogenicidade PAI O-122, codifica a linfostatina, uma grande proteína de superfície que inibe a proliferação de linfócitos, a síntese de citocinas pró-inflamatórias e esta relacionada com a adesão de cepas aEPEC a célula hospedeira (Mercado *et al.*, 2016).

Em adição aos fatores citados acima, algumas estruturas amplamente encontradas em *E. coli*, inclusive em cepas comensais, como o pilus ECP (*E. coli Common Pilus*), a fímbria curli e o pilus ou fímbria do tipo 1 (T1F), também desempenham um papel auxiliar no processo de colonização e infecção do hospedeiro, atuando em conjunto com outros fatores de virulência. O ECP, conhecido inicialmente como MatB (“*meningitis-associated and temperature-regulated fimbriae*”) e identificado em uma cepa de *E. coli* extra-intestinal O18:K1:H7, associada a meningite e septicemia neonatal, parece desempenhar papel importante na adesão as linhagens celulares humanas HEp-2 e HeLa. Este pilus é composto por uma subunidade de 21 KDa notavelmente similar ao produto do gene *yagZ* (agora *ecpA*), presente em diversas estirpes de *E. coli*, incluindo cepas comensais (Rendón *et al.*, 2007).

As fímbrias curli são compostas estruturalmente por fibras amiloides, sendo o principal componente proteico da matriz extracelular produzida por Enterobacteriaceae durante a formação de biofilme, desempenhando papel fundamental para a persistência de *E. coli* no ambiente (Smith *et al.*, 2017). Além disso, esta fímbria também foi associada a adesão e invasão à célula hospedeira, na ativação de resposta imune pró-inflamatória e, recentemente, na proteção contra a ação do complemento (Bian *et al.*, 2000; Biesecker *et al.*, 2018; Gophna *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006).

A T1F, codificada pelo operon *fimAICDFGH*, é outro fator amplamente distribuído em *E. coli*, onde a proteína FimH, normalmente encontrada na extremidade da estrutura fimbrial, reconhece resíduos de α -1,4 manose ligados na região N-terminal de glicoproteínas de superfície celular na célula hospedeira (Marshall *et al.*, 2016).

Uma grande variedade de sorotipos é descrita em cepas de aEPEC, além dos sorotipos EPEC clássicos. Hernandez e colaboradores (Hernandez *et al.*, 2009) relataram a ocorrência de 113 sorogrupos diferentes, descritos num total de 746 cepas de aEPEC, com 81% das cepas não relacionadas aos sorogrupos EPEC clássicos e 26% não tipáveis; sendo os sorogrupos mais frequentes: O26, O51, O55, O111, O119 e O145. Desta forma, este grupo de cepas não possui necessariamente uma relação filogenética mais próxima às cepas EPEC típicas. Muito pelo contrário, diversas cepas de aEPEC demonstram serem mais relacionados as cepas STEC, quanto ao sorotipo e presença de marcadores de virulência (ex.: cepas aEPEC do sorotipo O55:H7), suscitando a hipótese de que este grupo compreende cepas que adquiriram/perderam elementos genéticos em diferentes momentos da evolução, como cepas de EHEC que perderam os genes da toxina Shiga (*stx*-), ou cepas tEPEC destituídas do plasmídeo pEAF, dentre uma gama de outros genes (Hernandez *et al.*, 2009, 2011; Trabulsi *et al.*, 2002).

O diagnóstico e a identificação de cepas EPEC, como revisado recentemente por Gomes *et al.* (2016), vão além do isolamento da bactéria nos meios de cultura usuais (como ágar EMB e MacConkey), pois requerem a utilização de ferramentas que possibilitem a detecção antigênica e/ou de fatores de virulência característicos a este patotipo, de forma a diferenciar cepas EPEC das *E. coli* comensais. Sendo assim, EPEC pode ser detectada por meio de sondas de DNA ou ensaios de PCR, utilizando iniciadores específicos para os genes *eae* e *stx* (*stx1* e *stx2*) (Gannon *et al.*, 1993), onde todas as cepas positivas para o primeiro gene, indicativo da presença da região LEE (comum a EPEC e EHEC), e negativas para o segundo, o que descarta a hipótese de cepas STEC, são classificadas como EPEC. A seguir, a diferenciação entre as cepas tEPEC e aEPEC é realizada pela detecção do gene *bfpA* e/ou o plasmídeo pEAF, também por PCR (Gunzburg *et al.*, 1995). No entanto, a abordagem por PCR pode não ser capaz de identificar todas as cepas *bfpA*-positivas, uma vez que são observados diversos alelos para este gene, dificultando o desenho de iniciadores que englobem todas as variantes (Blank *et al.*, 2000).

No entanto, nos laboratórios de rotina, tradicionalmente todas as colônias de *E. coli* obtidas das fezes, no isolamento primário, são testadas por meio de ensaios de soroprecipitação, utilizando antissoros específicos para os sorogrupos clássicos de EPEC: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (Gomes *et al.*, 2016). Este método é prático e simples de realizar, além do fato de que os antissoros estão disponíveis comercialmente. Contudo, embora epidemiologicamente relevante, a grande

heterogeneidade de sorogrupos dentro de EPEC (onde alguns sorogrupos são comuns também em outras cepas não-EPEC), a ocorrência de outros sorogrupos em EPEC e a incapacidade de diferenciar as cepas tEPEC das aEPEC, são desvantagens que comprometem a especificidade deste método (Gomes *et al.*, 2016).

Desde que as cepas EPEC foram definidas com base em suas características de virulência, algumas proteínas (incluindo a intimina, o BFP e algumas proteínas secretadas via T3SS) foram consideradas potenciais alvos para o diagnóstico (Gomes *et al.*, 2016). A expressão do BFP é considerada um marcador fenotípico das cepas tEPEC (Abe *et al.*, 2009; Nara *et al.*, 2010). Ensaios de imunofluorescência e *imunoblotting* utilizando anticorpos policlonais e monoclonais contra o BFP foram empregados para este fim (Girón *et al.*, 1995; Gismero-Ordoñez *et al.*, 2002). No que diz respeito à detecção da expressão de intimina, alguns autores utilizaram anticorpos policlonais de coelho, desenhados a partir de uma região conservada da intimina (Int388-667), a fim de detectar cepas tEPEC que expressem os subtipos α , β , γ , δ e ϵ por meio de *imunoblotting*, relatando 100% de especificidade e 97% de sensibilidade em cepas *E. coli eae*-positivas, o que também demonstra a relevância de antissoros policlonais contra a intimina como ferramenta diagnóstica para EPEC (Adu-bobie *et al.*, 1998; Batchelor *et al.*, 1999; Menezes *et al.*, 2009; Caravelli *et al.*, 2013). Em relação a proteínas secretadas via T3SS, Lu *et al.* (2002) desenvolveram um método prático para identificar EPEC por meio da detecção da proteína EspB (*E. coli secreted protein B*) no sobrenadante da cultura por RPLA (sigla em inglês para *Reversed Passive Latex Agglutination*), após cultivo em meio D-MEM. Adicionalmente, Nakasone *et al.* (2006) por meio de um teste imunocromatográfico (IC) rápido, e Rocha *et al.* (2014), utilizando partículas de látex conjugadas com anti-EspB mAb, desenvolveram métodos com elevadas sensibilidade e especificidade para detectar a presença de EspB em cepas EPEC e EHEC, representando opções acessíveis aos países em desenvolvimento, onde muitos laboratórios não dispõem de infra-estrutura adequada para ensaios mais complexos.

O tratamento de infecções por cepas EPEC irá variar de acordo com o quadro clínico e a idade do paciente. Na maioria dos casos infecções por EPEC levam ao desenvolvimento de diarreia aguda, com abundante perda de água e eletrólitos nas fezes, podendo evoluir para quadros mais graves e até fatais, com desidratação e desnutrição severa em indivíduos mais susceptíveis, como crianças abaixo de 12 meses de idade (Hu & Torres, 2016). Além dos quadros agudos, algumas cepas aEPEC já foram associadas à diarreia persistente (>14 dias) em crianças (Afset *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2006), e também à diarreia sanguinolenta em

alguns casos (Hu & Torres, 2016). Segundo o Ministério da Saúde (MS), respaldado no Manual de Tratamento de Diarréia da OMS (2005), em casos de diarreia aguda (grande maioria) o tratamento indicado é a hidratação, ou seja, o aumento do consumo de líquidos, que pode ser realizada na unidade de saúde (com a ingestão de soluções de reidratação oral [SRO]) ou no próprio domicílio (com a ingestão de água de arroz, soro caseiro, chás, sucos e sopas). Neste processo é importante manter a alimentação habitual, como o aleitamento materno, a fim de prevenir desnutrição. A suplementação com zinco é indicada em crianças abaixo de 5 anos (<6 meses:10mg/dia; >6 meses:20mg/dia) durante 10 a 14 dias. Em casos de desidratação grave é indicada a hidratação venosa com soro fisiológico a 0,9% (10-20mL/Kg em crianças menores de 5 anos) nos primeiros 30 minutos, seguida da infusão de soro fisiológico associado com soro glicosado (5%) e KCl (10%) pelas próximas 24 horas, concomitante a hidratação oral quando possível.

A antibioticoterapia só é indicada, a princípio, em casos de disenteria, onde além da diarréia, há sangue ou muco nas fezes. Neste caso, em crianças, o tratamento é realizado com ciprofloxacino (15mg/Kg) a cada 12 horas por 3 dias; ou ceftriaxona (50-100mg/Kg) intramuscular, uma vez ao dia, por 2-5 dias como alternativa. No caso de adultos, utiliza-se ciprofloxacino (500mg) de 12 em 12 horas por 3 dias.

Em síntese, aEPEC compreende diversas linhagens distintas que emergiram paralelamente por meio da aquisição horizontal de determinantes de virulência específicos, os quais, nas mais variadas combinações, foram compondo seu genoma acessório, conferindo-lhe a capacidade de causar doença (Ingle *et al.*, 2016). Segundo Hernandez *et al.* (2009) o fato de algumas cepas de aEPEC carregarem diferentes combinações de genes de virulência não seria uma surpresa, uma vez que estes genes estão associados à plasmídeos conjugativos, ilhas de patogenicidade (PAIs), transposons e bacteriófagos, elementos genéticos móveis que são disseminados por transferência horizontal, seja no ambiente intestinal ou no meio ambiente.

Alguns estudos abordaram a relação entre cepas aEPEC e EHEC, quanto ao ganho e a perda dos genes codificadores da toxina de Shiga. Bielaszewska *et al.* (2007) isolaram cepas EHEC e aEPEC (*stx* negativo) do sorotipo O26:H11 geneticamente relacionadas em fezes de crianças com HUS na Alemanha, observando a perda do fago após passagem em cultura e a lisogênese das cepas aEPEC com o fago presente nas cepas EHEC, sugerindo que este fenômeno ocorra durante o curso da infecção em humanos. Em estudo recente, Eichhorn *et al.* (2018) obtiveram sucesso na transdução lisogênica “*in vitro*” de cepas aEPEC isoladas de diferentes hospedeiros mamíferos (roedor, bovino e humano) com o modelo de bacteriófago

Φ3538 Δ stx2::cat, evidenciando que algumas cepas aEPEC de origem animal são de fato potenciais progenitoras de cepas EHEC. Levando em consideração a alta prevalência e a ampla gama de hospedeiros, somadas ao risco de aquisição dos genes *stx*, cepas aEPEC podem representar um importante risco de infecções zoonóticas.

Apesar do sucesso global na redução da mortalidade infantil nas últimas três décadas, casos de diarreia continuam a ser a segunda principal causa de morte devido a infecções em crianças abaixo dos cinco anos de idade no mundo (Lanata *et al.*, 2013). Segundo dados da Unicef (traduzido como: Fundo das Nações Unidas para a Infância), a diarreia é uma das principais causas de mortalidade infantil, respondendo por 8% de todas as mortes em crianças com menos de 5 anos de idade no mundo em 2016. Isso representa mais de 1.300 mortes por dia ou cerca de 480.000 crianças por ano, apesar da disponibilidade de tratamento (<http://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/> - acessado em 09/08/2018). Lanata *et al.* (2013) relataram que cepas de EPEC e ETEC, além dos vírus entéricos, Rotavírus e Calicevírus, estão implicadas em mais da metade de todas as mortes por diarreia em crianças abaixo de cinco anos no mundo.

Nos últimos anos houve uma mudança de paradigma na epidemiologia das cepas EPEC. Por um longo período infecções por aEPEC permaneceram praticamente restritas a países desenvolvidos, onde a ocorrência de infecções por tEPEC vem diminuindo nas últimas décadas. Nos países em desenvolvimento as cepas típicas ainda representam um problema de saúde pública; contudo, dados recentes apontam para a emergência de infecções por aEPEC, chegando a exceder aquelas por tEPEC, em um cenário semelhante aos países desenvolvidos (Croxen *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2012; Santona *et al.*, 2013). Estudos descrevem a ocorrência de cepas aEPEC e sua relevância e emergência como agente de diarreia infantil também no Brasil (Pitondo-Silva *et al.*, 2014; Spano *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2016) e em outros países da América Latina (Silveyra *et al.*, 2015; Varela *et al.*, 2015; Vasco *et al.*, 2016).

Infecções causadas por EPEC podem variar de formas subclínicas a casos de diarreia grave, muitas vezes fatais. Cepas tEPEC causam diarreia aquosa abundante, com muco e significativa perda de água e eletrólitos nas fezes. Somado a isso, a diarreia persistente e a decorrente má absorção de nutrientes podem agravar quadros de desnutrição (Hu & Torres, 2015). A transmissão de tEPEC geralmente segue a rota fecal-oral, por meio da transmissão direta por portadores humanos ou contaminação de superfícies e alimentos (como suplementos infantis). Os seres humanos são o único reservatório conhecido para tEPEC,

com crianças sintomáticas e assintomáticas e adultos assintomáticos sendo a fonte de contaminação mais provável (Gomes *et al.*, 2016).

Por outro lado, embora o papel das cepas aEPEC como um patógeno diarreio gênico ainda não esteja claro, em função de sua detecção em taxas semelhantes em pacientes sintomáticos e assintomáticos, diversos estudos apontam a responsabilidade deste patotipo em surtos e casos de diarreia, persistente e sanguinolenta (Afset *et al.*, 2004; Bielaszewska *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2005; Estrada-Garcia *et al.*, 2009; Hedberg *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 2010). Diferentemente das cepas típicas, aEPEC são encontradas em pacientes de todas as idades, incluindo adultos com HIV-AIDS (Gomes *et al.*, 2016). Além disso, são habitualmente isoladas de diversas espécies animais, com e sem sintomas de diarreia, incluindo animais de companhia (cães e gatos), bovinos, ovinos, caprinos, bubalinos, lagomorfos, primatas, e ungulados (Alvarez-Suárez *et al.*, 2016; Beraldo *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2012; Jay-Russell *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2016; Moura *et al.*, 2009; Sekse *et al.*, 2011; Monaghan *et al.*, 2013; Shabana *et al.*, 2013).

Frequentemente cepas aEPEC isoladas de humanos e de animais compartilham propriedades de virulência e apresentam alta similaridade genética (Moura *et al.*, 2009). Sorogrupos associados à diarreia em humanos já foram identificados em cepas isoladas de animais (tais como: O26, O103, O119, O128, O142 e O157) e, somada à sorotipagem, técnicas moleculares, como o “*Pulsed Field Gel Electrophoresis*” (PFGE) e o “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST) , contribuíram para demonstrar que animais domésticos e selvagens podem representar fontes de contaminação para o homem (Gomes *et al.*, 2016).

Para muitas bactérias a análise por PFGE ainda permanece como um método de tipagem “padrão ouro” em investigações de surtos e/ou em abordagens de vigilância sanitária. Em geral, as células bacterianas são suspensas em agarose, lisando-as com enzimas e detergentes “*in situ*”, para evitar a degradação mecânica do DNA genômico durante o processo de extração. O DNA é então digerido com endonucleases de restrição de baixa frequência de corte e separado por eletroforese em gel de agarose. Existem vários modos de separação PFGE, mas o “*Contour-clamped Homogeneous Electric Field*” (CHEF) é o mais comumente utilizado, que incorpora um gradiente de campo elétrico constante que corre paralelamente ao sentido de migração do DNA, com pulsos alternados de eletrodos secundários. Os padrões de restrição resultantes são normalizados com o auxílio de softwares de análise de imagem e comparados usando cálculos estatísticos de similaridade baseados no padrão de bandas (Maccannell, 2013).

A abordagem por MLST, por sua vez, permite a caracterização de cepas bacterianas utilizando o método de Sanger para sequenciar regiões (~500pb) localizadas no interior de sete genes constitutivos, conhecidos como “*housekeeping*” (isto é, genes necessários para a manutenção de funções celulares básicas). Assim, cada cepa é caracterizada por meio dos alelos em cada um dos sete loci, configurando o seu perfil alélico ou “*Sequence Type*” (ST). A análise por MLST permite a identificação de complexos clonais e traça relações filogenéticas dentro de um clado, determinando a ancestralidade entre cepas da mesma espécie. Embora tenhamos adentrado a era do sequenciamento de nova geração (NGS), o qual possibilitou a rápida leitura do genoma completo de microrganismos, o PFGE e o MLST ainda figuram como importantes ferramentas no diagnóstico, rastreamento e controle de infecções bacterianas, principalmente em países onde os custos das novas tecnologias ainda representam uma barreira (Pérez-Losada *et al.*, 2013).

Embora ainda não tenha sido demonstrada a transmissão direta entre animais e humanos, é possível sugerir que algumas cepas aEPEC são patógenos com potencial zoonótico e possuem uma grande variedade de espécies animais como reservatório (Gomes *et al.*, 2016). Os cães figuram como uma das principais espécies animais domesticadas pelo homem, coabitando e compartilhando o mesmo ambiente por milhares de anos. Ainda hoje este convívio ocorre praticamente em todo o mundo, sejam em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Como consequência deste contato íntimo, a possibilidade de transmissão de microrganismos patogênicos entre as duas espécies é extremamente elevada (Beutin, 1999). Algumas das zoonoses bacterianas transmitidas ao homem pelo cão incluem a campilobacteriose, salmonelose “não-typhoidal”, leptospirose, brucelose (*B. canis*), ehrlichiose, anaplasmose e febre Q (*Coxiella burnetii*) (Jacob & Lorber, 2015). Além destas infecções, a circulação e o compartilhamento de cepas de *E. coli* entre o cão e o homem (os próprios donos e outros humanos do convívio) são frequentes, fazendo do cão um reservatório potencial para cepas patogênicas desta espécie (Jacob & Lorber, 2015). EPEC já foi associada a infecções intestinais em cães adultos e filhotes, sendo também recuperada de animais saudáveis (Beutin, 1999; Moura *et al.*, 2009; Nakazato *et al.*, 2004). Turk *et al.* (1998), observaram a formação de lesão A/E em cães infectados com cepas EPEC. Alguns trabalhos descreveram a ocorrência de aEPEC nestes hospedeiros, observando cepas que compartilham os mesmos sorotipos, fatores de virulência e são geneticamente relacionadas às cepas humanas, suscitando a hipótese destas linhagens se deslocarem entre as populações humanas e caninas (Almeida *et al.*, 2012; Nakazato *et al.*, 2004; Puño-Sarmiento *et al.*, 2013).

Gomes *et al.*, 2004, ao avaliarem a ocorrência de cepas aEPEC em crianças abaixo de 10 anos com diarreia, nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, observaram uma variedade de sorotipos, com o sorotipo O51:H40 prevalecendo sob os demais. Trabalhos posteriores reforçaram o potencial diarreiogênico de cepas humanas do sorotipo O51:H40, descrevendo sua capacidade de aderir e invadir células intestinais “*in vitro*” e “*in vivo*”, além do papel de diferentes estruturas nestes processos (Moreira *et al.*, 2008; Sampaio *et al.*, 2009, 2011, 2014, 2016). A capacidade de invadir e sobreviver dentro dos enterócitos representa uma adaptação destes patógenos às condições adversas do ambiente extracelular, como o estresse físico (baixo pH, secreção de muco e o fluxo intestinal) e os mecanismos de defesa do sistema imune (SI), incluindo exfoliação do tecido, deposição do complemento, opsonização por anticorpos e subsequente reconhecimento por macrófagos e células T citotóxicas (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006). Segundo Sampaio *et al.* (2011), a capacidade de invadir, sobreviver e persistir no ambiente intracelular pode contribuir também para o estabelecimento de um quadro diarreico persistente em alguns pacientes infectados por aEPEC.

Nos últimos vinte anos diversos estudos evidenciaram o potencial de cepas aEPEC em aderir, formar lesão A/E e invadir células epiteliais, incluindo as linhagens intestinais humanas Caco-2 e T84 (Moreira *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2014; Pelayo *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2001; Sampaio *et al.*, 2009, 2011, 2014, 2016; Yamamoto *et al.*, 2009). As linhagens Caco-2 e T84 são derivadas de um adenocarcinoma colorretal, sendo a primeira originária de um tumor primário e a segunda a partir de metástase de origem pulmonar. Ambas as linhagens sofrem um processo de diferenciação espontânea quando em cultura, levando a formação de monocamadas de células que expressam diversas características morfológicas e funcionais de um enterócito, com as células Caco-2 assemelhando-se a enterócitos maduros de crista, enquanto que as células T84 mimetizam enterócitos indiferenciados de cripta (Sambuy *et al.*, 2005; Devriese *et al.*, 2017).

Em estudo anterior, conduzido por nosso grupo, Almeida *et al.* (2012), avaliaram a ocorrência de aEPEC em fezes de cães filhotes (até 3 meses) com diarreia entre os anos de 2003 e 2004, recuperando 21 cepas de vários sorotipos, destacando-se os sorotipos O11:H16, O4:H16, O49:H10 e O51:H40, já descritos na literatura associados a casos de diarreia em crianças (Gomes *et al.*, 2004). Além disso, foi observado nas cepas caninas um comportamento comumente apresentado por cepas patogênicas: padrão de aderência LAL em células HeLa e acumulação de actina pelo teste FAS (“*Fluorescent Actin Staining*”), sugerindo a capacidade de produzir lesão A/E. Em trabalho subsequente do nosso grupo,

Araes (2009), comparando as cepas caninas dos sorotipos citados acima, com cepas isoladas de humanos de sorotipo correspondente, observou uma marcante similaridade entre os dois grupos, tanto na ocorrência de genes de virulência, como nos perfis de polimorfismo genético por RAPD (“*Random Amplification of Polymorphic DNA*”).

Em suma, aEPEC compõe um grupo bastante diverso dentro das *E. coli* produtoras de lesão A/E, amplamente disseminado na natureza, sendo isolado de diferentes espécies animais. Embora estudos apontem a circulação destas bactérias na interface animal/homem, a associação de cepas aEPEC animais com doença sintomática em humanos ainda é um desafio, sendo necessários estudos de subtipagem e patogênese mais precisos a fim de elucidar o potencial zoonótico destas linhagens. Neste sentido, o presente estudo procurou comparar cepas isoladas de cães com cepas humanas de mesmo sorotipo, quanto às características genotípicas e fenotípicas de virulência, procurando descrever similaridades que sustentem a capacidade patogênica destas cepas quando transmitidas para o homem.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar e comparar o potencial patogênico entre cepas de *Escherichia coli* Enteropatogênicas atípicas (aEPEC) isoladas de cães com diarreia e de casos de diarreia infantil, pertencentes aos sorotipos O4:H16, O11:H16, O49:H10 e O51:H40.

1.2 Específicos

- a) Investigar, em cepas aEPEC caninas e humanas de igual sorotipo, a ocorrência de genes codificadores de adesinas, moléculas efetoras e outros fatores de virulência encontrados em cepas de *E. coli* diarreiogênicas;
- b) Detectar a expressão das fímbrias Curli e T1F entre as cepas por meio de ensaios fenotípicos;
- c) Avaliar a similaridade genética entre as cepas aEPEC caninas e humanas de mesmo sorotipo por meio de técnicas moleculares;
- d) Avaliar a interação das cepas com células intestinais humanas “*in vitro*” quanto a aderência, invasão e sobrevivência intracelular.

2 METODOLOGIA

2.1 Cepas bacterianas

Neste estudo foi utilizado um total de dez cepas identificadas previamente como aEPEC. Deste total, cinco foram isoladas de fezes de cães filhotes (*Canis familiaris*) com quadro clínico de diarreia no período entre 2003 e 2004 no Rio de Janeiro, dado publicado anteriormente por Almeida *et al.* (2012). Em contrapartida, as outras cinco cepas foram isoladas de casos de diarreia em crianças com menos de dois anos de idade entre 1989 e 1990 em São Paulo, em estudo de Vieira *et al.* (2001) (n=2) e entre 1998 e 2001 no Rio de Janeiro, por Girão *et al.* (dado não publicado) (n=3). As cepas caninas e humanas utilizadas neste estudo não possuem nenhuma relação epidemiológica. Tais cepas foram previamente caracterizadas quanto ao sorotipo, características fenotípicas e genotípicas de virulência, sendo os sorotipos O4:H16, O11:H16, O49:H10 e O51:H40 identificados tanto nas cepas humanas como nas caninas (Quadro1).

Quadro 1 – Relação das cepas de aEPEC utilizadas neste estudo

Cepas	Fonte de isolamento	Idade	Sinais clínicos	Sorotipo	Estado	Ano de isolamento	Referência
2.3	Cães	≤ 3 m	Diarreia	O51:H40	RJ	2003-2004	1
21	Cães	≤ 3 m	Diarreia	O51:H40	RJ	2003-2004	1
41.5	Cães	≤ 3 m	Diarreia	O4:H16	RJ	2003-2004	1
46	Cães	≤ 3 m	Diarreia	O11:H16	RJ	2003-2004	1
75	Cães	≤ 3 m	Diarreia	O49:H10	RJ	2003-2004	1
4361-2 (H1)	Humanos	1a / 9 m	Diarreia	O51:H40	SP	1989	2
1461-1 (H2)	Humanos	1a / 10 m	Diarreia	O11:H16	SP	1989	2
98222 (H3)	Humanos	2 a	Diarreia	O4:H16	RJ	1998	3
21535 (H4)	Humanos	2 m	Diarreia	O49:H10	RJ	2001	3
21323 (H5)	Humanos	1a / 6 m	Diarreia	O51:H40	RJ	2001	3

Legenda: a - ano; m - meses. RJ - Rio de Janeiro; SP - São Paulo.

Fonte: 1 - Almeida *et al.*, 2012; 2 - Vieira *et al.*, 2001; 3 - Girão, 2007.

Todas as cepas bacterianas estavam acondicionadas em meio de estoque (caldo BHI [Oxoid, Hampshire, Inglaterra] com 20% de glicerol) em freezer -20°C. Para a reativação das cepas as mesmas foram inoculadas em caldo soja tripticaseína (TSB; Oxoid) e posteriormente semeadas em ágar soja tripticaseína (TSA; Oxoid), ambos com incubação de 18-24 h à 37°C.

2.1.1 Caracterização prévia das cepas

Todas as 10 cepas analisadas neste estudo foram previamente caracterizadas para alguns marcadores genotípicos e fenotípicos de virulência por Almeida *et al.* (2012) e Arais (Dissertação de mestrado, 2010). Os primeiros autores citados acima caracterizaram as variantes dos genes *eae*, *tir*, *espA* e *espB* das cepas isoladas de cães e o padrão de aderência quando interagindo “*in vitro*” com células HeLa. Em estudo do mesmo grupo (Arais, 2010), comparou características genotípicas das cepas caninas com cepas humanas quanto à presença de outros marcadores de virulência e a relação genética pela técnica de RAPD. Parte destes dados encontra-se sintetizada na Figura 1.

2.2 **Investigação de marcadores adicionais de virulência**

Além dos marcadores de virulência previamente identificados, no presente estudo foram pesquisados, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), genes adicionais relacionados à virulência e patogênese comumente encontrados em cepas do patotipo STEC: *hcpA*, *iha*, *paa*, *csgBA*, *saa*, *toxB*, *ehxA*, *espP*, *efa-1* e *pilS*, além dos genes *ecpA* e *csgAB*, comuns em diversos patotipos. Somado a isso, também por meio da PCR, foi pesquisada a presença de genes que codificam moléculas efetoras secretadas pelo T3SS localizados fora da região LEE (“*Non-LEE Effectors*”): *nleA*, *nleB*, *nleB2*, *nleC*, *nleD*, *nleE*, *nleF*, *nleG*, *nleG2-1*, *nleG2-3*, *nleG5-2*, *nleG6-2*, *nleG9*, *nleH1-1*, *nleH1-2* e *ent/espL2*. A relação dos iniciadores utilizados neste estudo encontra-se descrita no Quadro 2.

Todos os ensaios de PCR foram realizados nas seguintes condições: 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 0,2µM de cada primer e 0,5U de Taq DNA Polimerase (Ludwig, Rio Grande do Sul, Brasil). As reações foram levadas ao termociclador modelo Applied

Biosystems Veriti (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) sob o seguinte ciclo de amplificação: etapa inicial

Figura 1 – Análise prévia das cepas aEPEC caninas e humanas: sorotipagem, ocorrência e caracterização de genes de virulência, similiaridade genética e fenótipo de aderência em células Caco-2 após 3 horas de interação

Análise por RAPD**	Genes de virulência									Sítio de inserção de LEE*	Aderência em Caco-2**
	Cepas	Sorotipo*	<i>eae</i>	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>tccP</i>	<i>tccP2</i>	<i>fimH</i>		
			*	*	*	*	**	**	**		
	H4	O49:H10	β/δ	α	NR	α	-	-	+	<i>selC</i>	LAL
	75	O49:H10	β/δ	α	α	α	-	-	+	<i>selC</i>	LAL
	21	O51:H40	γ	α	α	α	-	-	+	ND	LAL
	H3	O4:H16	β	β	NR	β	-	+	+	<i>pheU</i>	LAL
	41.5	O4:H16	β	β	β	β	-	+	+	<i>pheU</i>	LAL
	H2	O11:H16	β	β	NR	β	+	-	+	<i>pheU</i>	LAL
	46	O11:H16	β	β	NR	β	+	-	+	<i>pheU</i>	LAL
	H5	O51:H40	θ/γ	α	NR	α	-	-	-	ND	LAL
	H1	O51:H40	θ/γ	α	NR	α	-	-	+	ND	LAL
	2.3	O51:H40	γ	α	α	α	-	-	-	ND	LAL

Legendas: ND - não determinado; NR - não realizado; AA - aderência agregativa; LAL - aderência localizada “like. * - realizado por Almeida *et al.* (2012); ** - realizado por Araís (2010).

de 94°C por 2 m; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, a temperatura de anelamento correspondente dos iniciadores (Quadro 2) por 30s e 72°C por 30-60s; seguido de extensão final de 72°C por 8 m. A temperatura de anelamento referente a cada par de iniciadores se encontra no Quadro 2. O DNA molde foi obtido por meio de lise térmica (100°C por 10 m) de uma suspensão de 5-10 colônias a partir de crescimento por 16-18 h à 37°C em TSA, seguido de uma breve centrifugação para precipitar os restos celulares.

Após a amplificação os produtos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1%, com tensão entre 80 e 100V e corrente entre 25 e 40mA, em tampão Tris-borato EDTA 0,5X. O gel foi corado com solução de brometo de etídio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) e revelado sob luz UV em foto-documentador do modelo L-PIX (Loccus, São Paulo, Brasil).

As seguintes cepas foram utilizadas como controle positivo nas reações de PCR: cepa EDL933 (sorotipo O157:H7) para os genes: *hcpA*, *iha*, *toxB*, *ehxA*, *espP*, *paa*, *efa-1* e todos os 16 genes *nle* pesquisados; cepa EC784 (O113:H21) para os genes *saa* e *pilS*; e cepa E2348/69 (O126:H7) para os genes *efa-1*, *ecpA* e *csgBA*. Como controle negativo foi utilizada a cepa *E. coli* K12 DH5α em todas as reações.

2.3 Ensaios fenotípicos “*in vitro*” de observação da expressão de fímbria Curli, fímbria do tipo I (T1F) e da fermentação do sorbitol

A expressão de fímbria Curli foi avaliada por meio da capacidade das bactérias de absorver o corante vermelho congo quando semeadas na superfície do Ágar Vermelho Congo (CRA), segundo formulação e protocolo adaptados de Bak *et al.* (2015) (Luria Bertani ágar [LB; Oxoid], sem adição de NaCl, contendo 40µg/mL de vermelho congo e 20µg/mL de azul de Coomassie, pH 7,2). Inicialmente, as cepas foram crescidas em 3mL de caldo LB (Oxoid) sem sal, por 48 h a 28°C. A seguir, alíquotas de 10µL foram semeadas na superfície de placa com CRA, sendo incubadas novamente por 48 h a 28°C. Após este período colônias com coloração rosa/alaranjada foram consideradas positivas para produção de fímbria Curli. As cepas EPEC E2348/69 e *E. coli* DH5α foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

Para a verificação da expressão da fímbria do tipo I, foram realizados ensaios de aglutinação manose-sensível de leveduras em lâmina, segundo protocolo modificado de Bak *et*

Quadro 2 – Descrição dos iniciadores utilizados neste estudo nos ensaios de PCR

Genes alvos	Fator de virulência	Sequência (5'-3')		T.an.* (°C)	Produto (pb)	Referência
		Sense	Anti-sense			
<i>ecpA</i>	<i>E. coli common pilus</i> (ECP)	GCAACAGCCAAAAAAGACACC	CCAGGTCGCGTCGAACT	52	476	Hernandes <i>et al.</i> , 2011
<i>hcpA</i>	<i>Hemorrhagic coli pilus</i> (HCP)	TCGCTAGTTGCTGACAGATTT	AATGTCTGTTGTGTGCGACTG	50	867	Xicohtencatl-Cortes <i>et al.</i> , 2007
<i>iha</i>	<i>IrgA homologue adhesin</i>	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	56	837	Johnson <i>et al.</i> , 2000
<i>paa</i>	<i>Porcine A/E-associated protein</i>	ATGAGGAAACATAATGGCAGG	TCTGGTCAGGTCGTCAATAC	50	350	Batissou <i>et al.</i> , 2003
<i>csgBA</i>	Curli	AAATCTAGAAACGCGCGGGTGAGTT ATTA	AAAGAATTCTCGTCTGACTTTGCCCT GAA	56	1337	Cookson <i>et al.</i> , 2002
<i>saa</i>	<i>STEC autoagglutinating adhesin</i>	CGTGATGAACAGGCTATTGC	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	54	119	Srimanote <i>et al.</i> , 2002
<i>pilS</i>	Fímbria do tipo IV (PilS)	TGAACTTCAGAGCACGTCTGTC	TCGCTACTGCAGACGGTAAC	55	502	Srimanote <i>et al.</i> , 2002
<i>toxB</i>	Proteína associada ao plasmídeo pO157 (ToxB)	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA	TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	58	602	Tatarczak <i>et al.</i> , 2005
<i>ehxA</i>	Enterohemolisina (pO157)	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	AATGACCCAAGCTGGTTAAGC	65	534	Paton & Paton, 1998
<i>espP</i>	<i>Extracellular serine protease</i> (pO157)	AAACAGCAGGCACTTGAACG	GGAGTCGTCAGTCAGTAGAT	56	1830	Brunder <i>et al.</i> , 1999
<i>efa-1</i>	<i>E. coli factor for adherence</i> (Similar ao gene <i>lifA</i>)	TGCGCACAATTGACTACAGAGGAA	ATACGACCATCAGGGAATCAC	58	692	Morabito <i>et al.</i> , 2003
<i>nleA</i>	Efetores não-LEE (NLE)	ATGAACATTCAACCGACCATAC	GACTCTTGTTTCTTGGATTATATCAAA	55	1296	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleB</i>		GGAAGTTTGTGTTACAGAGACG	AAAATGCCGCTTGATACC	55	297	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleB2</i>		GTTAATACTAAGCAGCATCC	CCATATCAAGATAGATACACC	52	475	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleC</i>		ACAGTCCAACCTCAACTTTTCC	ATCGTACCCAGCCTTTTCG	55	777	Coombes <i>et al.</i> , 2008

Legendas: T.an. – temperatura de anelamento.

Quadro 2 – Descrição dos iniciadores utilizados neste estudo (continuação)

Genes alvos	Fatores de virulência	Sequência (5'-3')		T.ann. (°C)	Produto (pb)	Referência
		Sense	Anti-sense			
<i>nleD</i>	Efetores não-LEE (NLE)	GGTATTACATCAGTCATCAAGG	TTGTGGAAAACATGGAGC	55	426	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleE</i>		GTATAACCAGAGGAGTAGC	GATCTTACAACAAATGTCC	52	260	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleF</i>		ATGTTACCAACAAGTGGTTCTTC	ATCCACATTGTAAAGATCCTTTGTT	55	567	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleG</i>		ATGTTATCGCCCTCTTCTATAAAAT	ACTTAATACTACACTAATAAGATCCA	55	902	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleG2-1</i>		ACCAGAAACCTGACTTCG	CAGCATCTTCATATACTACAGC	55	406	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleG2-3</i>		GGATGGAACCATACTG	CGCAATCAATTGCTAATGC	56	551	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleG5-2</i>		TGGAGGCTTTACGTCATGTCG	CCGGAACAAAGGGTTCACG	55	504	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleG6-2</i>		CGGGTCAGTGGATGATATGAGC	AAGTAGCATCTAGCGGTCGAGG	55	424	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleG9</i>		GTTCGTGCCCGAATTGTAGC	CACCAACCAAACGAGAAAATG	55	409	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleH1-1</i>		GTTACCACCTTAAGTATCC	GTTTCTCATGAACACTCC	55	456	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>nleH1-2</i>		AACGCCTTATATTTTACC	AGCACAATTATCTCTTCC	52	589	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>ent/espL2</i>		GAATAACAATCACTCCTCACC	TTACAGTGCCCGATTACG	55	233	Coombes <i>et al.</i> , 2008
<i>adk</i>	Adenylate kinase	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	CCGTCAACTTTCGCGTATTT	54	583	Wirth <i>et al.</i> 2006
<i>fumC</i>	Fumarate hydratase	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	GTACGCAGCGAAAAAGATTC	54	806	Wirth <i>et al.</i> 2006
<i>gyrB</i>	DNA gyrase	TCGGCGACACGGATGACGGC	ATCAGGCCTTCACGCGCATC	60	911	Wirth <i>et al.</i> 2006

Legendas: T.an. – temperatura de anelamento.

Quadro 2 – Descrição dos iniciadores utilizados neste estudo (continuação)

Genes alvos	Fatores de virulência	Sequência (5'-3')		T.ann. (°C)	Produto (pb)	Referência
		Sense	Anti-sense			
<i>icd</i>	Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCC GGCACA	GGACGCAGCAGGATCTGTT	54	878	Wirth <i>et al.</i> 2006
<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGC TGCTGGCGG	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGA TATCTTTCTT	60	932	Wirth <i>et al.</i> 2006
<i>purA</i>	Adenylosuccinate dehydrogenase	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	CATACGGTAAGCCACGCAGA	54	816	Wirth <i>et al.</i> 2006
<i>recA</i>	ATP/GTP binding motif	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	58	780	Wirth <i>et al.</i> 2006

Legendas: T.an. – temperatura de anelamento.

al. (2015). Estas fímbrias se ligam os resíduos de manose, presentes em abundância na parede de leveduras. As cepas foram crescidas em 3mL de caldo LB sem NaCl por 24 h a 37°C. A seguir foram misturados volumes iguais do crescimento bacteriano e de uma suspensão em PBS de células de *Saccharomyces cerevisiae* a 0,5% (p/v) na superfície de uma lâmina de microscópio limpa e desengordurada. Após realização de movimentos circulares, foi averiguada a ocorrência de aglutinação das leveduras, indicativo da expressão de T1F pelas bactérias. Ensaio idêntico foi realizado com as cepas positivas após adição de 150µL de uma solução de D-manose a 20% (concentração final de 1%) aos tubos com crescimento em LB, homogeneização e reincubação por mais 1 hora a 37°C em condições estáticas. A adição de D-manose promove a saturação das fímbrias do tipo I com resíduos de manose, inibindo a aglutinação de leveduras. Desta forma, as cepas negativas nesta última etapa foram consideradas produtoras de T1F.

A capacidade de fermentar o sorbitol foi avaliada através de semeadura em meio ágar McConkey Sorbitol (Oxoid), caldo vermelho de fenol (Peptona 10g/L, Extrato de carne 1g/L, NaCl 5g/L, vermelho de fenol 0,018 g/L e sorbitol 10g/L) e meio semissólido OF (sorbitol 1%) com incubação de 24-72 h a 37°C. A presença de colônias rosadas indicou a fermentação do açúcar, enquanto que colônias transparentes foram consideradas negativas no ágar McConkey após 48 h de incubação. No caldo vermelho de fenol os tubos que viraram para cor amarela foram considerados positivos. Para o meio OF as cepas que viraram o meio para a cor amarela, nos tubos com e sem óleo mineral, após 72 h, foram consideradas positivas. As cepas EPEC E2348/69 e *E. coli* EDL933 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

2.4 Avaliação filogenética por meio da técnica de “*multi-locus sequence type*” (MLST)

As cepas foram semeadas em placas com TSA e incubadas a 37°C por 18-24 h. A seguir, foram escolhidas entre 5-10 colônias das quais o DNA total foi extraído com auxílio do kit “PureLink™ Genomic DNA” (Invitrogen, Califórnia, EUA). Este DNA foi mantido em freezer (-20°C) e utilizado para reação de PCR com iniciadores para os genes “*housekeeping*”: *adk* (adenilato cinase), *fumC* (fumarato hidratase), *gyrB* (DNA girase), *icd* (isocitrato/isopropilmalato dehidrogenase), *mdh* (malato dehidrogenase), *purA* (adenilosuccinato dehidrogenase) e *recA* (ATP/GTP recombinase A), descritos por Wirth *et*

al. (2006) (Quadro 2). Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose e purificados com o auxílio do kit “*High Pure PCR Product Purification*” (Roche, Risch-Rotkreuz, Suíça).

A seguir, os amplicons purificados foram amplificados e marcados com o kit “*BigDye Terminator V3.1*” (Thermo-Fisher), utilizando os mesmos iniciadores (sense e anti-sense) usados na reação de PCR. As sequências de DNA foram obtidas pelo método de Sanger, através de sequenciamento capilar, utilizando o equipamento “*ABI3130 Sequence Analyser*” (Thermo-Fisher) pertencente à plataforma de sequenciamento da Universidade Federal Fluminense (UFF), por meio do Laboratório de Multiusuários de Microbiologia e Parasitologia (LMMP). As sequências foram analisadas e editadas pelo software BioEdit versão 7.2.5 (disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e confrontadas com o banco de dados da Universidade de Warwick (<http://mLst.warwick.ac.uk/mLst/dbs/Ecoli>) afim de obter os alelos e o “*Sequence Type*” (ST).

Para a análise filogenética, as sequências de nucleotídeos dos sete alelos “*housekeeper*” de cada ST foram concatenadas na seguinte ordem: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, e *recA*, gerando um fragmento de 3.423 pb, como descrito por Xu *et al.* (2017). A árvore filogenética foi construída por meio do programa MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/>), utilizando o método “*neighbor-joining*”, baseado no modelo “*maximum composite likelihood*”, com 1.000 repetições de bootstrap. A fim de avaliar a relação genética entre as cepas estudadas e outras cepas dos patótipos EHEC/STEC e tEPEC foram adicionadas à análise sequências alélicas dos STs: ST11 (sorotipo O157:H7 - cepa EDL933), ST15 (O127:H6 - E2348/69), ST16 (O111:H8 - CL-37), ST17 (O103:H2 - 5714/96), ST21 (O26:H11 - 3593/00) e ST32 (O145:NM - 4672/99). Todas as sequências foram retiradas do banco de dados da Universidade de Warwick (<http://mLst.warwick.ac.uk/mLst/dbs/Ecoli>).

2.5 Avaliação da similaridade genética através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As cepas foram semeadas em tubos com TSA inclinado e incubadas por 18-24 h a 37°C em estufa bacteriológica. O crescimento bacteriano foi suspenso em tampão de suspensão celular (BSC) (EDTA 0,1M, Tris 0,1M, pH 8,0) até atingir uma D.O. de 0,8-1,0 à 610nm. Uma alíquota de 200µL da suspensão foi transferida para um microtubo contendo

10µL de solução de proteinase K (20mg/mL). A seguir foi adicionado 200µL de agarose (agarose Megabase certified 1% [Bio-Rad], em tampão TE), preparada anteriormente e mantida à 50°C em banho-maria. Após homogeneizar cuidadosamente, a suspensão foi distribuída em um molde específico para confecção dos blocos de agarose. Os moldes foram mantidos em geladeira (4-8°C) por 5 m, sendo posteriormente transferidos para um tubo tipo Falcon (15mL) contendo 2 mL de solução de lise (Tris 50mM, EDTA 50mM, SDS 1%, pH 8,0) e 10µL de proteinase K (20mg/mL). Os blocos foram mantidos por uma noite (16-18 h) em banho-maria a 50°C. A solução de lise foi retirada e procedeu-se com quatro lavagens com 10mL de tampão TE (EDTA 1,0mM, Tris 10mM, pH 8,0), por 1 hora cada, em banho-maria a 50°C. Em seguida os blocos foram ressuspensos em 2mL de TE e mantidos em geladeira (4-8°C) até a digestão.

Para a digestão do DNA bacteriano, foi seccionada uma fração de metade do plugue com o auxílio de um bisturi. Este foi inserido em um microtubo (1,5mL) previamente identificado e contendo 5µL do tampão da enzima e água ultrapura q.s.p. 50µL por 15 m. Após este período, foi retirado o tampão da enzima e adicionada a solução de restrição: 1µL de enzima XbaI (10U/µL, New England Biolabs, Massachusetts, EUA), 5µL do tampão da enzima, 10µL de albumina de soro bovino 1% (BSA) e água ultrapura q.s.p. 50µL. Os blocos foram então incubados em banho-maria 37°C durante 3 h. Como controle do padrão de peso molecular foi utilizado a cepa *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Braenderup H9812 (cedida gentilmente pelo Laboratório de Enterobactérias, IOC, Fiocruz, Brasil), também digerida nas mesmas condições.

Os blocos foram lavados com 2mL de TBE 0,5X e incorporados em gel de agarose (Agarose Pulsed Field certified, Bio-Rad) (1%). Este gel foi levado ao aparelho de eletroforese de campo pulsado CHEFDR-III (BioRad, Califórnia, EUA) para a corrida nas condições: 6,8 segundos de “switch time” inicial, 35,4 segundos de “switch time” final, voltagem de 6V, ângulo de 120°, tempo de corrida de 18 h em tampão TBE 0,5X mantido à 14°C. O gel foi corado com solução de brometo de etídio (C₂₁H₂₀BrN₃) e revelado sob luz UV em fotodocumentador do modelo L-PIX (Loccus).

A análise dos perfis de macrorestrição foi realizada com o auxílio do software “GelJ” (Disponível como freeware em <https://sourceforge.net/projects/gelj/>), desenvolvido e descrito por Heras *et al.* (2015). Na construção do dendograma foi utilizado o método UPGMA, com coeficiente de Dice e índice de tolerância de 1,0. As cepas que apresentaram um percentual de similaridade maior ou igual a 85% foram consideradas geneticamente relacionadas, segundo critério utilizado por Daoud *et al.* (2015).

2.6 Linhagens celulares empregadas e condições de cultivo das células

2.6.1 Linhagens celulares

Para a realização dos ensaios de interação bactéria-célula foram utilizadas as linhagens celulares humanas Caco-2 (ATCC HTB37; adenocarcinoma de cólon, representativa de enterócitos do topo das vilosidades), T84 (ATCC CCL248; tumor de cólon representativo de enterócitos das criptas) e HEp-2 (ATCC CCL23; carcinoma de laringe). A linhagem Caco-2 nos foi cedida pelo Dr. A. Zweibaum (“Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale”, Unité 178, Villejuif, France) e a linhagem T84 foi uma gentil doação da Dra. Tânia Gomes (UNIFESP). A linhagem HEp-2 foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, UFRJ).

2.6.2 Cultivo das linhagens celulares

A linhagem Caco-2 foi cultivada em meio D-MEM (Eagle’s Minimal Essential Medium, modificação de Dulbecco; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) tamponado com HEPES e suplementado com 1% de solução de aminoácidos não-essenciais (Invitrogen), 0,5% de L-glutamina (Merck, Darmstadt, Alemanha), antibióticos (gentamicina 50 µg/mL; fungizona 2,5 µg/mL) e 10% de soro fetal bovino inativado (SFB; Gibco, Califórnia, EUA) (Rosa *et al.*, 2001). Para a linhagem T84 utilizamos o meio D-MEM/F-12 Ham (Invitrogen) suplementado com 1,5% de HEPES, 0,5% de L-glutamina, antibióticos (gentamicina 50 µg/mL; fungizona 2,5 µg/mL) e 10% de SFB inativado (Pereira *et al.*, 2008). Para a linhagem HEp-2 utilizamos o meio MEM (Eagle’s Minimal Essential Medium; Invitrogen) suplementado com os antibióticos descritos anteriormente e 5% de SFB (Gonzales *et al.*, 2016). O cultivo foi realizado em garrafas plásticas de 25cm² com faces planas (Greiner, Kremsmünster, Áustria) contendo 5mL dos meios de cultivo específicos para cada célula e incubados a 37°C, em ar enriquecido com 5% de CO₂. Para a passagem das células, cobrimos os tapetes celulares com 10 mL de solução tripsina-EDTA (tripsina 2% [Difco, Nova Jersey, EUA]; EDTA 0,02% [Merck] em PBS 0,01M [pH 7,2] sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) (Bird & Forrester, 1981). Após

remoção da solução tripsina-EDTA, adicionamos 5 mL de meio e as células foram deslocadas do suporte e dispersas no meio pela pipetagem suave e repetida do meio de cultura. A suspensão foi então dividida para duas novas garrafas, sendo estas incubadas até os tapetes celulares atingirem a confluência.

2.6.3 Preparo dos tapetes celulares para os testes de aderência e de invasão

Após tratamento com a solução de tripsina-EDTA a suspensão celular foi diluída a 1:20 em meio completo, correspondendo a aproximadamente 10^5 células/mL. Volumes de 1 mL foram então distribuídos nos poços de placas (24 poços) para cultura de células (Greiner). Para os testes de aderência, depositamos lamínulas de vidro circulares estéreis (13 mm de diâmetro) em cada poço. Para os testes quantitativos de invasão, as células eram cultivadas diretamente no fundo dos poços. As placas foram incubadas a 37°C em ar com 5% de CO₂ pelo tempo desejado, de forma a se obterem tapetes celulares não confluentes, trocando-se o meio de cultivo a cada 48 h. Nas condições adotadas, após 5 dias de cultivo as células Caco-2 e T-84 formam numerosas ilhotas separadas, caracterizando um tapete celular não confluyente. Nestas ilhotas, as células situadas nas margens mostram-se intensamente proliferativas, não-polarizadas e não-diferenciadas. Após 10 a 12 dias de cultivo, as células Caco-2 atingem a pós-confluência, tornando-se polarizadas e crescentemente diferenciadas. As células T84 necessitam 12-13 dias para atingirem a confluência. A linhagem celular HEP-2 não sofre polarização ou diferenciação e após 48-72 h de cultivo formam tapetes com cerca de 70% de células confluentes.

2.7 **Fenótipo de aderência nas linhagens celulares HEP-2 e T84**

Todas as cepas bacterianas foram crescidas em tubos de 16x100 contendo 5mL de TSB por 18 a 20 h à 37°C sem agitação. Os ensaios de interação para avaliação do fenótipo de aderência foram realizados tendo por base metodologia proposta em estudos anteriores (Rosa *et al.*, 2001; Gonzales *et al.*, 2016). Uma alíquota de 1mL deste crescimento foi transferida para um microtubo estéril de 1,5 mL e centrifugada a 14.000 RPM por 4 m. O sobrenadante

foi descartado e o sedimento ressuspensão com 1 mL de solução salina tamponada com fosfatos, 0,1M, pH 7,2-7,4 (PBS). A partir desta, preparou-se outra suspensão em PBS com D.O. de 0,1 à 680nm (equivalente a concentração de 10^7 UFC/mL) a qual foi utilizada para inocular tapetes não confluentes das linhagens HEp-2 e tapetes polarizados da linhagem intestinal T84, crescidos sobre lamínulas de vidro dispostas no fundo dos poços (item 2.7.3).

Após o tapete celular ser lavado duas vezes com PBS, foi recoberto com 1mL do meio de cultura adequado (MEM para HEp-2 e D-MEM para Caco-2 e T84, suplementados com 1% de D-manose e 2% de SFB), e então inoculado (dois poços por amostra) com 100µL da suspensão bacteriana padronizada (10^6 UFC / poço) foi inoculado. A placa foi então incubada à 37°C em estufa com CO₂ por 3 h (Caco-2 e T84) e 6 h (HEp-2), com troca de meio após 3 h no último caso. A seguir o tapete foi lavado 2 vezes com 1mL de PBS, fixado com metanol por 10 m e corado com solução de Giemsa (Merck) diluída 1:30 em em solução tamponada com fosfatos (pH6,5). A placa foi mantida em geladeira (4-8°C) por uma noite e após concluída a coloração procedemos a montagem permanente das lamínulas sobre lâmina de vidro, empregando a resina Entellan (Merck).

2.8 Ensaios quantitativos de invasão em células das linhagens Caco-2 e T84

Os ensaios de interação para avaliação do percentual de invasão das linhagens Caco-2 e T84 foram realizados tendo por base metodologia proposta em estudos anteriores (Rosa *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2011). Os tapetes celulares das linhagens intestinais Caco-2 e T84 foram crescidos no fundo dos poços das microplacas pelo tempo necessário para obter crescimento não confluyente ou confluyente e diferenciado/polarizado (ver item 2.7.3). No momento do ensaio, os tapetes foram lavados com suavidade duas vezes com PBS e recobertos com 1 mL de D-MEM (com 1% de D-manose e 2% de SFB), ambas soluções previamente equilibradas a temperatura de 37°C em banho-maria.

A seguir foi inoculada uma alíquota de 100µL ($1-3,0 \times 10^6$ UFC) da suspensão bacteriana padronizada (igual ao descrito no item 2.8) em cada poço (seis poços por amostra) e idêntico inóculo das cepas controle: *Salmonella entérica* sorotipo Typhimurium C20, como controle positivo de invasão celular, e *E. coli* DH5α, como controle negativo da aderência/invasão (três poços cada). As placas foram incubadas à 37°C em estufa com atmosfera com ar-5% de CO₂ por 3 h.

Após este período, foram realizadas duas lavagens com PBS de forma vigorosa, mas evitando o impacto direto do líquido no tapete celular. Em seguida, foi adicionado 1mL de meio D-MEM (1% de D-manose e 2% de SFB) a cada poço, sendo que em quatro poços o meio foi suplementado com 250µg/mL de amicacina (Sigma-Aldrich) e nos dois outros poços não foi adicionado o antibiótico (poços controle). Novamente a placa foi incubada por 1 hora nas condições já descritas. Todas as cepas apresentaram susceptibilidade a amicacina, determinada previamente por meio de ensaios de disco-difusão em ágar Mueller Hinton com discos de 30µg (Oxoid), segundo orientações do CLSI 2017.

A seguir, os poços foram lavados duas vezes com PBS, recobertos com 1mL da solução de lise (Triton X-100 1% [Merck] em PBS 0,1M) e incubados por 30 m em estufa convencional a 37°C. Em seguida, o lisado foi vigorosamente homogeneizado com o auxílio de uma pipeta plástica de 1mL com bulbo (Sigma; Z135070). O volume de 200µL de cada poço foi transferido para a primeira coluna de uma microplaca de 96 poços, os 4 poços subsequentes de cada fileira preenchidos com 180µL de PBS e transferidos volumes de 20µL do lisado, procedendo-se assim a uma diluição seriada (razão 10) de 10^{-1} até 10^{-4} . Alíquotas de 10µL de cada diluição foram inoculadas em triplicata em ágar TSA. As placas foram incubadas a 37°C por 12-18 h. Para o cálculo do índice de invasão (%): o número de bactérias intracelulares (média das UFC/mL dos poços tratados com antibiótico) foi dividido pelo número total de bactérias associadas (intra e extracelulares) (média das UFC/mL dos poços sem antibiótico) e multiplicado por 100.

2.9 Ensaios de determinação dos índices de persistência (sobrevivência) intracelular em células da linhagem T84

Os ensaios de interação para avaliação da persistência intracelular em células da linhagem T84 foram realizados tendo por base metodologia proposta em estudos anteriores (Sampaio *et al.*, 2011; Cordeiro *et al.*, 2013). As cepas foram crescidas em tubos com 5mL de TSB por 18-20 h à 37°C sem agitação. Uma alíquota de 1mL deste crescimento foi transferida para um microtubo estéril de 1,5 mL e centrifugada a 14.000 RPM por 4 m. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em PBS, até obtermos uma concentração celular de aproximadamente $1-3,0 \times 10^8$ UFC/mL (D.O.^{680nm} = 0,4).

Os tapetes celulares da linhagem T84 foram crescidos no fundo dos poços das microplacas (24 poços) até obtermos crescimento confluyente e polarizado (ver item 2.7.3). O número total de microplacas utilizado foi calculado de forma a cobrir os tempos de incubação de 2, 24 e 48 h. No momento do ensaio, os tapetes foram lavados com suavidade duas vezes com PBS e recobertos com 1 mL de D-MEM (com 1% de D-manose e 10% de SFB), ambas soluções previamente equilibradas a temperatura de 37°C em banho-maria.

A seguir foi inoculada uma alíquota de 10µL da suspensão bacteriana (equivalendo a 10^6 UFC) em cada poço (seis poços por amostra). *S. Typhimurium* C20 foi usada como controle positivo de invasão celular. Imediatamente as microplacas foram centrifugadas por 10 m a 730 x g (temperatura ambiente), para otimizar a interação bactéria-célula e sincronizar o processo de invasão. As placas foram então incubadas à 37°C em estufa com ar-5% de CO₂ por 1 hora. Após este período, os tapetes foram lavados com suavidade duas vezes com PBS 0,1M, recobertos com 1 mL do meio de infecção suplementado com 250µg/mL de amicacina e novamente incubados por 1 hora.

Concluída a incubação, os tapetes foram novamente lavados com PBS e nas microplacas referentes ao tempo de 2 h de infecção foi adicionado 1mL da solução de lise (Triton X-100 1% em PBS) em cada poço, sendo as placas incubadas a 37°C por 30 m. Após este período o conteúdo de cada poço foi homogeneizado vigorosamente com o auxílio de uma pipeta plástica estéril para lise total das células e liberação das bactérias sobreviventes de seu interior. Diluições seriadas decimais de cada poço foram feitas em PBS 0,1M e o volume de 10µL do lisado/diluições foi semeado em triplicata na superfície de uma placa de TSA. Após 16-18 h de incubação a 37°C, foi efetuada a contagem de colônias e o cálculo de UFC/poço, determinando a população bacteriana sobrevivente no compartimento intracelular após 2 h de infecção

Para as demais microplacas (tempos de 24 e 48 h de infecção) após o período inicial de 2 h, o meio de infecção com 250µg/mL de amicacina foi removido e os poços foram recobertos com 1mL do mesmo meio, porém suplementado com 10µg/mL de amicacina e re-incubadas à 37°C (ar-5% CO₂). Completados os tempos desejados (24 ou 48 h de infecção) as microplacas correspondentes foram lavadas e tratadas com solução de lise como descrito acima, sendo o lisado e as diluições semeados em placas de TSA para contagem das bactérias sobreviventes após os períodos investigados.

2.10 Microscopia de imunofluorescência com marcação diferencial entre as populações intracelulares e extracelulares após interação com tapetes da linhagem T84

Os ensaios foram realizados segundo orientações propostas por Cordeiro *et al.* (2013) com adaptações. Apenas as cepas do sorotipo O51:H40, e não com os demais sorogrupos estudados (O4, O11 e O49), foram utilizadas nos ensaios, em virtude da disponibilidade de anticorpo policlonal de coelho para o antígeno somático O51 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca). As amostras bacterianas foram cultivadas em 5mL de TSB por 18-20 h à 37°C sem agitação. A partir do cultivo, foram preparados inóculos para infectar tapetes celulares, como descrito no item 2.8. Foram empregados tapetes celulares polarizados da linhagem T84 cultivados sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços. No momento do ensaio, os tapetes foram lavados com suavidade duas vezes com PBS e recobertos com 1mL de D-MEM (1% de D-manose e 2% de SFB), ambas as soluções previamente equilibradas a temperatura de 37°C em banho-maria.

Uma alíquota de 100µL ($1-3,0 \times 10^6$ UFC) da suspensão bacteriana padronizada foi inoculada por poço (total de três poços por amostra). Imediatamente a microplaca foi centrifugada por 10 m a 730 x g (temperatura ambiente), para otimizar a interação bactéria-célula e em seguida incubada à 37°C em estufa com ar-5% de CO₂ por 3 h. Após este tempo, os tapetes foram lavados 2 vezes com PBS e recobertos com 1mL de solução de paraformaldeído (Sigma) a 4% (p/v) em PBS por 15 m, a temperatura ambiente. A seguir removeu-se o volume de 500µL do paraformaldeído, completando com igual volume de PBS, decaindo assim a concentração de paraformaldeído para 2%; as microplacas foram mantidas em geladeira (4-8°C) por 12-18 h.

A seguir, removeu-se as lamínulas da solução fixadora, transferindo-as para outra placa de 24 poços e lavando-as duas vezes com PBS (5 m/vez). Após remover o tampão, foi pipetado 500µL de solução de BSA (Sigma) a 5% em PBS (solução de bloqueio) nos poços, incubando-se as laminulas por 30 m a temperatura ambiente.

Para a marcação das bactérias extracelulares, o anticorpo primário (anticorpo policlonal [coelho] para o antígeno somático O51) foi diluído em PBS + BSA (1%) na razão 1:20. Em uma câmara úmida foram pipetadas gotículas de 50µL do anticorpo diluído na superfície de um filme (ParaFilm M), depositando as lamínulas com a face contendo as células em contato com o anticorpo primário. Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS (5 m/vez). Em seguida, as

lamínulas foram novamente incubadas na solução de bloqueio e tratadas com anticorpo secundário (anti IgG de coelho [cabra] conjugado com Alexa 594; Invitrogen) diluído a 1: 150 em PBS+BSA (1%). Procedeu-se exatamente da mesma maneira que na incubação com o anticorpo primário, exceto com o cuidado de manter as lamínulas ao abrigo da luz. A seguir as lamínulas foram devolvidas para seus respectivos poços e lavadas mais duas vezes com PBS (5 m/vez).

A seguir, para a marcação das bactérias intracelulares inicialmente as células foram permeabilizadas com 1mL de solução de Triton X-100 em PBS (0,1%) por 5 m a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A permeabilização pelo Triton permite que o anticorpo tenha acesso as bactérias intracelulares. Após lavagem e tratamento pela solução de bloqueio, incubamos as lamínulas com o anticorpo primário (coelho, anti-O51) como já descrito. Após lavagem e novo bloqueio, as lamínulas foram tratadas com o anticorpo secundário destinado a marcar as bactérias intracelulares (anti-IgG de coelho [cabra] conjugado com Alexa 488; Invitrogen), procedendo-se da maneira já descrita. Após lavagem em PBS, as lamínulas foram cobertas com 500µL da solução de DAPI (Invitrogen) (0,1µL/mL), incubadas por 1 m e lavadas 3 vezes com 1 mL de água deionizada.

Concluídas as marcações, as lamínulas foram montadas sobre lamina de vidro com a resina Prolong Gold (Invitrogen) e após polimerização (12-18 h, temperatura ambiente) as laminas foram guardadas na geladeira, protegidas da luz. A observação foi realizada em microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan 2 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e as imagens (filtros verde, vermelho e azul e microscopia de fase) foram capturadas com câmera AxioCam (Zeiss), digitalizadas (programa AxioVision 4; Zeiss) e posteriormente processadas com o aplicativo Adobe Photoshop CS6 (Microsoft).

2.11 Análise gráfica e estatística sobre os ensaios de invasão com as linhagens Caco-2 e T84 e ensaios de persistência em células T84

A análise gráfica e estatística dos dados foi realizada com o uso do software “GraphPad Prism” 6.0 (GraphPad Software). Para avaliar a significância das diferenças nos percentuais de invasão observados entre os tapetes não confluentes e polarizados das linhagens Caco-2 e T84 (com as cepas do sorotipo O51:H40) e entre as cepas caninas e humanas nos ensaios com tapetes polarizados da linhagem T84, além da variação na

população intracelular após 2, 24 e 48 h de interação com células T84, foi utilizado o teste *t* não pareado bicaudal, utilizando o valor de $P < 0,05$ para caracterizar diferenças significativas. O grau de confiança foi categorizado da seguinte forma: “*” ($P < 0,05$), “**” ($P < 0,01$) e “***” ($P < 0,001$).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da presença dos genes de virulência por PCR e da expressão das fímbrias Curli e T1F

Todas as 10 amostras foram positivas para o gene *ecpA*, e negativas para os genes *iha*, *saa*, *paa*, *ehxA*, *espP* e *pilS*. O gene *hcpA* foi identificado em cinco amostras, duas isoladas de cães (2.3 e 21) do sorotipo O51:H40 e três cepas humanas (H5, H3 e H4) dos sorotipos O51:H40, O4:H16 e O49:H10 respectivamente. Além disso, o gene *toxB* ocorreu nas duas cepas do sorotipo O49:H10 (H4 e 75), ambas foram negativas para fermentação do sorbitol em ágar MacConkey/sorbitol e meio OF/sorbitol após 48 h de incubação à 37 °C, embora tenham fermentado lentamente o sorbitol após incubação de 48 h à 37°C em caldo vermelho de fenol (Tabela 1).

Os genes *nle* (*non-LEE effectors*) pesquisados apresentaram uma combinação variada, porém cepas de igual sorotipo demonstraram um padrão similar (Tabela 3). No total foram pesquisados quatro genes localizados na PAI-36 (*nleB2*, *C*, *D* e *H1-1*), três genes na PAI-57 (*nleG2-3*, *G5-2* e *G6-2*), seis na PAI-71 (*nleA*, *F*, *G*, *G2-1*, *G9* e *H1-2*) e três na PAI-122 (*nleB*, *E* e *ent/espL2*). As cepas do sorotipo O49:H10 (H4 e 75) foram positivas para 10 genes *nle* dos 16 pesquisados. As cepas do sorotipo O4:H16 (H3 e 41.5) apresentaram 9 genes *nle*, com a cepa canina positiva para os genes *nleF* e *nleH1-2*, negativos no isolado humano. Nas amostras do sorotipo O51:H40 (H1, H5, 2.3 e 21) foi observada a presença de 7 genes *nle*, com o gene *nleG9* presente apenas na amostra canina 2.3. Todas as cepas descritas acima apresentaram ao menos um gene de cada ilha de patogenicidade pesquisada (PAI-36, PAI-57, PAI-71 e PAI-122). Por fim, as cepas do sorotipo O11:H16 (H2 e 46) foram positivas apenas para 4 genes *nle*, com a ausência dos genes presentes na PAI-36 e na PAI-122 (Tabela 2).

Todas as cepas foram positivas para a região contendo os genes *csgBA* por PCR, indicando a presença do operon responsável pela produção da fímbria curli; além de expressarem essa fímbria em meio CRA (Tabela 1). A expressão da T1F foi observada nas cepas que amplificaram o gene *fimH* por PCR (ensaios realizados anteriormente), com exceção da cepa humana H4, do sorotipo O49:H10, que não foi capaz de aglutinar células de levedura em nossa abordagem experimental (Tabela 1).

Tabela 1 – Ocorrência dos marcadores de virulência, expressão de adesinas e fermentação do sorbitol em cepas aEPEC de origem canina e humana

Amostra	Fonte	Sorotipo	Genes de virulência												Testes fenotípicos		
			<i>efa-1</i>	<i>ecpA</i>	<i>hcpA</i>	<i>iha</i>	<i>toxB</i>	<i>ehxA</i>	<i>espP</i>	<i>pilS</i>	<i>paa</i>	<i>saa</i>	<i>csgBA</i>	<i>fimH</i> *	Curli	T1F	Sorbitol
H1	Humano	O51:H40	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2.3	Cão	O51:H40	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
21	Cão	O51:H40	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
H5	Humano	O51:H40	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
H2	Humano	O11:H16	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
46	Cão	O11:H16	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
H3	Humano	O4:H16	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
41.5	Cão	O4:H16	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
H4	Humano	O49:H10	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
75	Cão	O49:H10	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Legenda: * - resultado obtido por Araís (2010); T1F - fímbria do tipo 1.

Tabela 2 – Ocorrência e distribuição de genes *nle* (*non-LEE-encoded effectors*) por ilha de patogenicidade (PAI) em cepas aEPEC de origem canina e humana

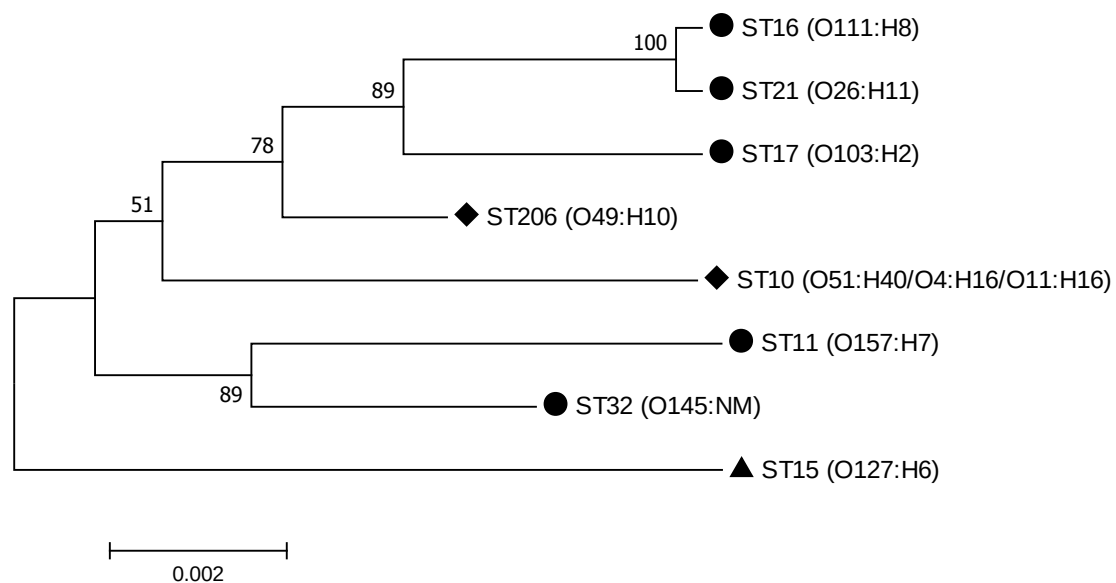
Amostra	Sorotipo	Non-LEE-encoded effector(s)															
		PAI-36				PAI-57			PAI-71						PAI-122		
		<i>nleB2</i>	<i>nleC</i>	<i>nleD</i>	<i>nleH1-1</i>	<i>nleG2-3</i>	<i>nleG5-2</i>	<i>nleG6-2</i>	<i>nleA</i>	<i>nleF</i>	<i>nleG</i>	<i>nleG2-1</i>	<i>nleG9</i>	<i>nleH1-2</i>	<i>nleB</i>	<i>nleE</i>	<i>ent/espL2</i>
H1 ^h	O51:H40	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
2.3 ^c	O51:H40	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
21 ^c	O51:H40	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
H5 ^h	O51:H40	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
H2 ^h	O11:H16	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
46 ^c	O11:H16	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
H3 ^h	O4:H16	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
41.5 ^c	O4:H16	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
H4 ^h	O49:H10	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
75 ^c	O49:H10	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

Legendas: h - origem humana; c - origem canina.

3.2 Análise por “multi-locus sequence type” (MLST)

As cepas caninas e humanas dos sorotipos O51:H40, O4:H16 e O11:16 apresentaram homologia total dos 7 alelos dos genes “housekeeping”: *adk* (alelo 10), *fumC* (alelo 11), *gyrB* (alelo 4), *icd* (alelo 8), *mdh* (alelo 8), *purA* (alelo 8) e *recA* (alelo 2); classificando-as dentro do “sequence type 10” (ST10), o qual é membro do complexo clonal 10 (CC10) segundo o banco de dados da Universidade de Warwick. De modo similar, as duas cepas do sorotipo O49:H10 apresentaram os mesmos alelos: *adk* (alelo 6), *fumC* (alelo 7), *gyrB* (alelo 5), *icd* (alelo 1), *mdh* (alelo 8), *purA* (alelo 18) e *recA* (alelo 2), referentes ao ST206 (CC206). A figura 2 representa a análise filogenética dos STs 10 e 206, em associação com os STs 11, 16, 17, 21 e 32, comuns às cepas EHEC/STEC dos sorotipos O157:H7, O111:H8, O103:H2, O26:H11 e O145:NM respectivamente; além do ST15, ao qual pertence a cepa de EPEC típica E2348/69 (O127:H6).

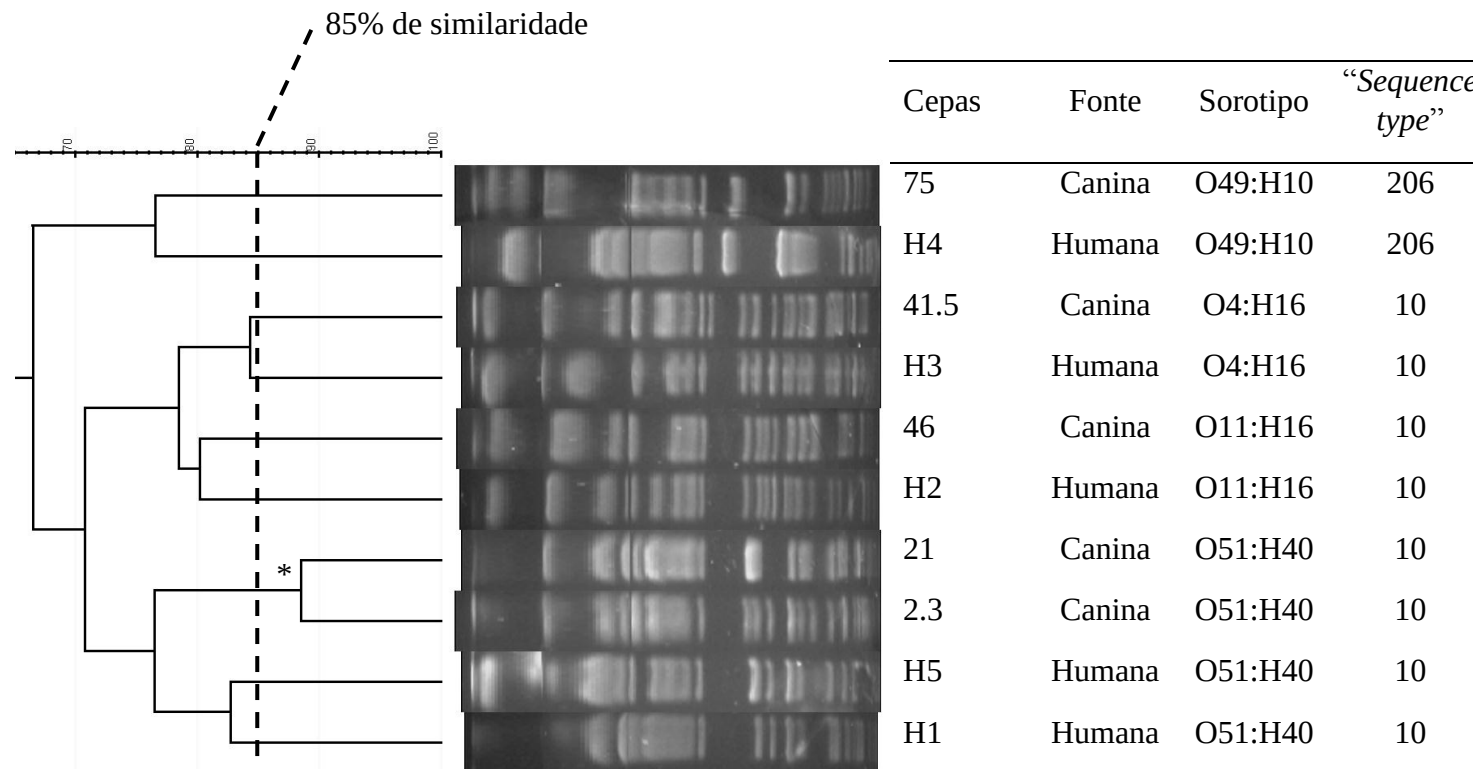
Figura 2 – Relação filogenética entre os “sequence types” 10 e 206, identificados nas cepas aEPEC humanas e caninas no presente estudo, e outros STs comuns aos patótipos EHEC/STEC e tEPEC. A árvore filogenética foi construída pelo método “Neighbor-joining”, baseado no modelo “maximum composite likelihood”, com 1.000 replicas de “Bootstrap”.



3.3 Caracterização do perfil de macrorestrição por PFGE

A análise da similaridade genética por meio do perfil de macrorestrição pela técnica de PFGE possibilitou a divisão entre as cepas dos STs 10 e 206: as cepas de igual sorotipo de origem canina e humana foram agrupadas, com identidades variando de 84%, 80% e 77% entre os sorotipos O4:H16, O11:H16 e O51:H40 respectivamente, do ST10; e de 77% entre as duas cepas do sorotipo O49:H10, classificadas como ST206. O dendograma com a análise dos perfis de bandas está representado na Figura 3. Apenas as cepas caninas do sorotipo O51:H40 (2.3 e 21) apresentaram um percentual de similaridade acima de 85% (88%), onde, segundo o critério utilizado (Daoud *et al.*, 2015), foram consideradas geneticamente relacionadas entre si (Figura 3).

Figura 3 – Análise da similaridade genética por meio do perfil de macrorestrição (PFGE) associada às características antigênicas e filogenéticas das cepas caninas e humanas de aEPEC. O dendograma foi construído utilizando o software GelJ, pelo método UPGMA com coeficiente de Dice e índice de tolerância de 1.5

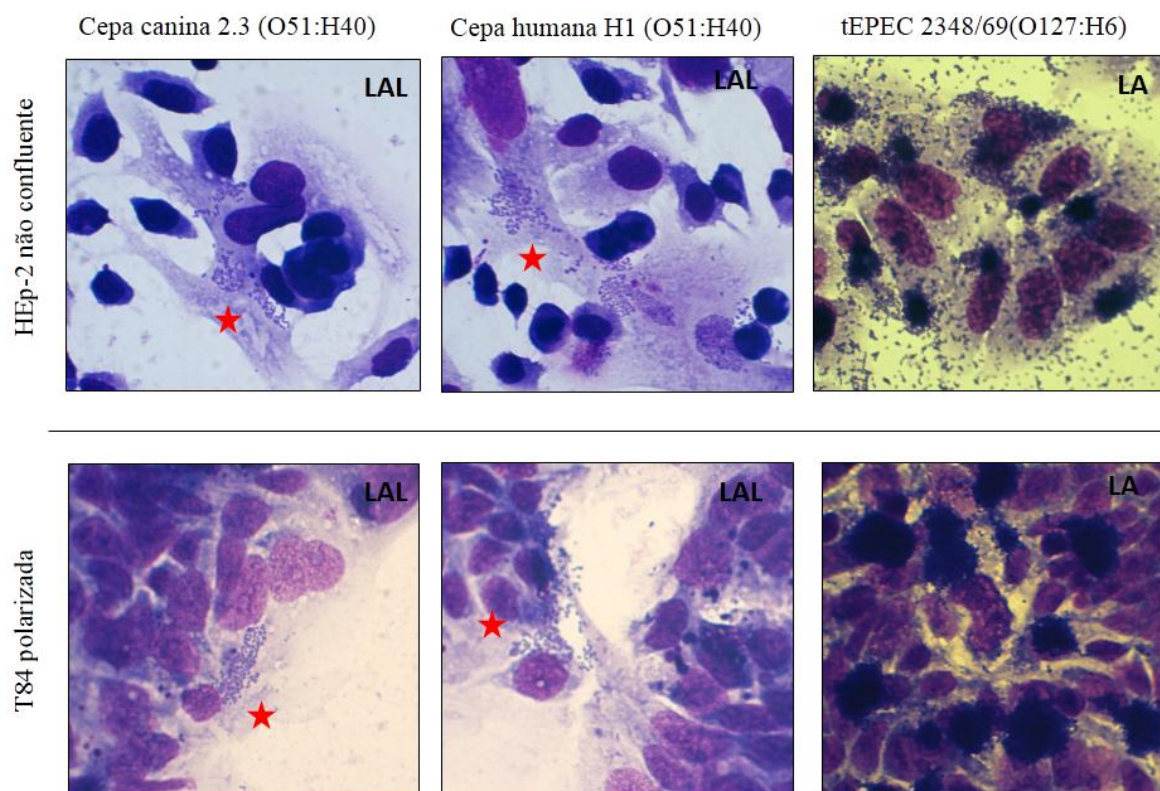


Legendas: * - cepas relacionadas geneticamente, segundo critério utilizado por Daoud *et al.* (2015).

3.4 Fenótipo de aderência nas linhagens celulares HEp-2 e T84

Todas as amostras apresentaram um fenótipo de aderência “localizada-like” (*localized adherence-like*; LAL) após 6 h de interação em tapetes não confluentes da linhagem HEp-2 e em tapetes polarizados da linhagem intestinal T84 (Figura 4). Nos ensaios com tapetes confluentes da linhagem T84 as microcolônias só foram observadas nas regiões de borda ou quando há exposição da região basolateral das células, contrastando com a cepa tEPEC 2348/69 (O127:H6), que apresentou o fenótipo LA e formou microcolônias mesmo na superfície apical do tapete íntegro (Figura 4).

Figura 4 – Imagens representativas, após coloração das células por solução de Giemsa, do fenótipo de aderência em células das linhagens HEp-2 e T84 após 6 horas de incubação: LAL, cepas aEPEC 2.3 e H1 (O51:H40), e LA, cepa tEPEC 2348/69 (O127:H6)



Legendas: LA- aderência localizada; LAL- aderência localizada “like”; estrela- microcolônias na superfície das células.

3.5 Avaliação comparativa da invasão celular em tapetes não confluentes e polarizados das linhagens Caco-2 e T84 com as cepas 2.3, 21 e H1 do sorotipo O51:H40

Ensaio quantitativo de invasão às células intestinais das linhagens Caco-2 e T84 realizados inicialmente com as cepas H1, 2.3 e 21, pertencentes ao sorotipo O51:H40, evidenciaram a capacidade destas cepas de invadir células em tapetes não confluentes e tapetes polarizados de ambas as linhagens. Os índices de invasão individuais de cada ensaio, com a média e o desvio padrão, encontram-se descritos na Tabela 3. Os ensaios com tapetes polarizados da linhagem Caco-2 possibilitaram observar uma redução da média percentual de invasão quando comparado aos ensaios com cultivos não confluentes (Tabela 3). Nos ensaios com a linhagem T84, tal comportamento só foi observado na amostra 2.3, que apresentou uma redução do índice de invasão de 7,1% para 4,1% em tapetes não confluentes e polarizados respectivamente. Para a amostra H1 houve apenas uma pequena redução no percentual de invasão (8,6 para 8,0%) e na amostra 21 houve um aumento de 2,0 para 4,7% (Tabela 3).

A média do total de bactérias associadas (extracelulares + intracelulares) observadas nas cepas H1, 2.3 e 21 após 3 h de interação com os tapetes polarizados, foi similar para as duas linhagens celulares: aproximadamente $2,9 \times 10^5$ UFC em Caco-2 frente a $3,1 \times 10^5$ UFC em T84. Em contrapartida, a média da população intracelular apresentada pelas cepas nos ensaios com tapetes polarizados da linhagem Caco-2 foi 67% inferior à média dos ensaios com T84 ($5,6 \times 10^3$ UFC vs $1,7 \times 10^4$ UFC).

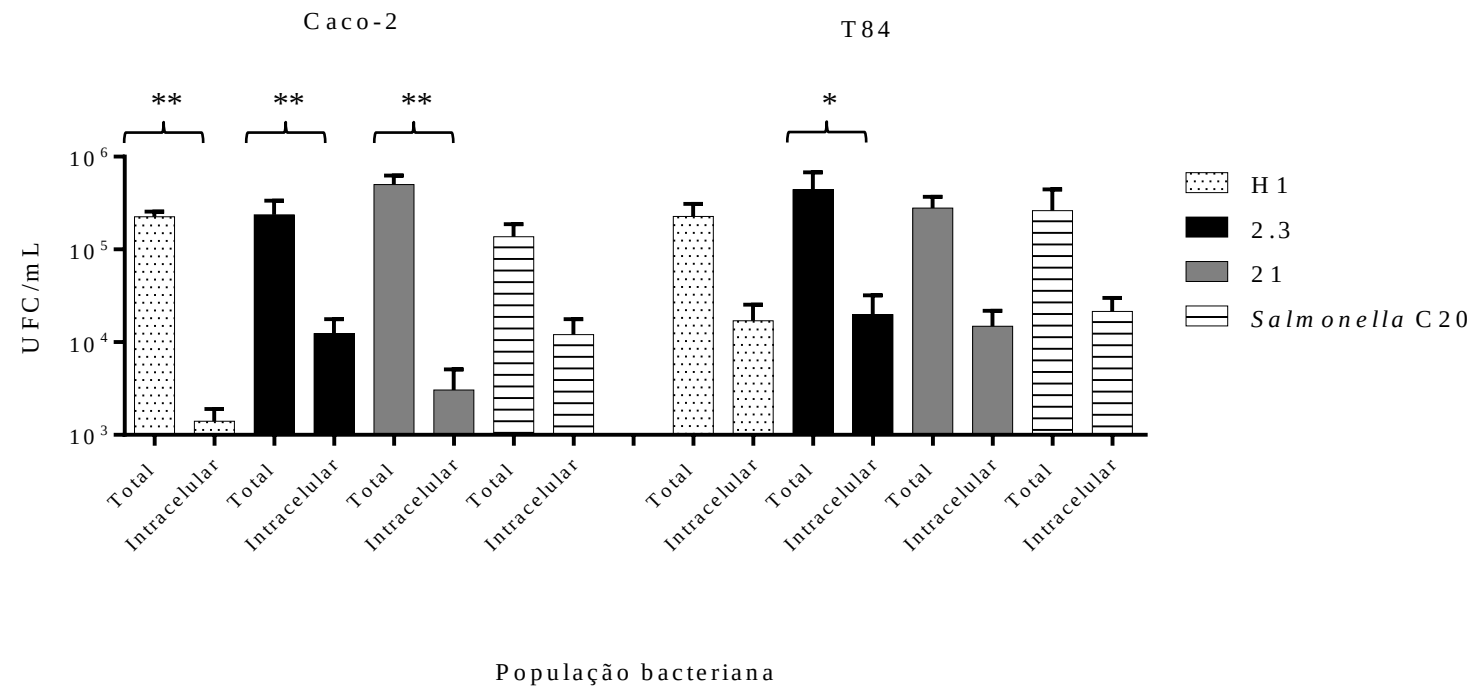
No Gráfico 1 observa-se a população total e intracelular nas cepas H1, 2.3 e 21 após 3 h de interação com tapetes polarizados das linhagens Caco-2 e T84. A análise estatística demonstrou significativa redução no percentual de invasão em tapetes polarizados da linhagem Caco-2, quando comparamos com os valores observados em tapetes não confluentes, onde foram observados os valores de $p < 0,05$ nas cepas 2.3 ($p=0,0081$), 21 ($p=0,0088$) e H1 ($p=0,0025$), em contraste com a cepa *S. Typhimurium* C20 ($p=0,2133$) (Gráfico 1). Em contrapartida, a variação do percentual de invasão entre tapetes não confluentes e polarizados da linhagem T84 não apresentou significância para as cepas 21 ($p=0,3810$) e H1 ($p=0,3211$), embora a cepa 2.3 tenha sofrido significativa redução ($p=0,0279$) (Gráfico 1). Frente a estes resultados o ensaio em tapetes polarizados da linhagem T84 foi tomado como modelo de invasão para as demais cepas aEPEC utilizadas neste estudo.

Tabela 3 – Avaliação quantitativa da associação e invasão celular pelas cepas H1, 2.3 e 21 (sorotipo O51:H40) em ensaios com tapetes não confluentes e diferenciados das linhagens intestinais Caco-2 e T84 após 3 horas de interação

Célula	Ensaio (E)	Amostras [nº associação/nº intracelular (% intracelular)]				Média Total	Salmonella C20
		H1	2.3	21			
Caco-2	Não confluyente	E1	3,0x10 ⁴ /3,0x10 ³ (10%)	1,3x10 ⁵ /1,8x10 ⁴ (13,3%)	2,1x10 ⁴ /1,6x10 ³ (7,7%)		1,6x10 ⁵ /3,1x10 ⁴ (19%)
		E2	6,3x10 ⁴ /4,2x10 ³ (6,6%)	2,2x10 ⁵ /2,2x10 ⁴ (10%)	5,3x10 ⁴ /2,3x10 ³ (4,3%)		ND
		E3	3,4x10 ⁴ /3,5x10 ³ (10,4%)	2,4x10 ⁴ /3,7x10 ³ (15,7%)	1,4x10 ⁴ /1,2x10 ³ (8,4%)		9,0x10 ⁴ /1,65x10 ⁴ (18%)
		Média(σ)	9,0% (1,70)	13%(2,33)	6,8% (1,79)	9,6%	18,5% (0,5)
	Diferenciado	E1	1,9x10 ⁵ /1,3x10 ³ (0,67%)	1,2x10 ⁵ /6,2x10 ³ (5%)	3,5x10 ⁵ /1,4x10 ³ (0,4%)		1,0x10 ⁵ /8,5x10 ³ (8,5%)
		E2	2,3x10 ⁵ /1,9x10 ³ (0,8%)	2,9x10 ⁵ /1,6x10 ⁴ (5,5%)	5,7x10 ⁵ /2,4x10 ³ (0,4%)		1,2x10 ⁵ /1,8x10 ⁴ (15%)
		E3	2,5x10 ⁵ /9,5x10 ² (0,37%)	2,9x10 ⁵ /1,5x10 ⁴ (5%)	5,8x10 ⁵ /5,4x10 ³ (0,9%)		1,9x10 ⁵ /9,2x10 ³ (4,8%)
		Média(σ)	0,61% (0,18)	5,16% (0,23)	0,56%(0,23)	2,1%	9,4% (4,21)
T84	Não confluyente	E1	5,0x10 ⁴ /4,0x10 ³ (8%)	5,8x10 ⁴ /5,2x10 ³ (8,9%)	6,5x10 ⁵ /2,1x10 ³ (0,3%)		2,6x10 ⁴ /5,0x10 ³ (19%)
		E2	6,6x10 ³ /4,7x10 ² (7,2%)	1,73x10 ⁴ /1,21x10 ³ (7%)	4,5x10 ⁴ /1,8x10 ³ (4%)		1,8x10 ⁴ /2,7x10 ³ (15%)
		E3	4,5x10 ⁵ /4,8x10 ⁴ (10,7%)	2,9x10 ⁶ /1,54x10 ⁵ (5,4%)	2,5x10 ⁶ /4,8x10 ⁴ (1,9%)		1,0x10 ⁶ /2,4x10 ⁵ (24%)
		Média(σ)	8,6% (1,49)	7,1% (1,43)	2,0% (1,51)	5,9%	19% (3,68)
	Diferenciado	E1	2,3x10 ⁵ /1,9x10 ⁴ (8,2%)	2,9x10 ⁵ /1,2x10 ⁴ (4,1%)	2,7x10 ⁵ /1,1x10 ⁴ (4,0%)		2,2x10 ⁴ /2,0x10 ³ (9,0%)
		E2	1,3x10 ⁵ /9,7x10 ³ (7,5%)	3,3x10 ⁵ /1,2x10 ⁴ (3,6%)	3,4x10 ⁵ /1,0x10 ⁴ (2,9%)		2,1x10 ⁴ /3,3x10 ³ (15,7%)
		E3	3,3x10 ⁵ /2,8x10 ⁴ (8,5%)	7,9x10 ⁵ /3,7x10 ⁴ (4,7%)	3,5x10 ⁵ /2,5x10 ⁴ (7,1%)		3,9x10 ⁵ /2,7x10 ⁴ (6,9%)
		Média(σ)	8,0% (0,41)	4,1% (0,44)	4,7% (1,77)	5,6%	10% (3,75)

Legenda: (σ) - desvio padrão.

Gráfico 1 – Relação entre a população total associada ao tapete e a população intracelular nas cepas H1, 2.3 e 21 (O51:H40) após 3 horas de interação com tapetes polarizados das linhagens Caco-2 e T84



Legenda: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

3.6 Determinação do percentual de invasão celular por cepas aEPEC caninas e humanas em tapetes polarizados da linhagem T84 após 3 horas de interação

Os ensaios de invasão demonstraram, de uma forma ampla, um comportamento similar entre as cepas caninas e humanas de igual sorotipo: capacidade de aderir e invadir células T84 após 3 h de interação (Gráficos 2 e 3). Na avaliação quantitativa da população total associada ao tapete celular (Ou seja, tanto bactérias extracelulares, aderidas na superfície, quanto intracelulares, localizadas no interior de vacúolos endocíticos), as cepas 46 e H2 (O4:H16), 41.5 e H3 (O11:H16), além da cepa humana H4 (O49:H10), apresentaram um número médio 8,4 vezes maior de bactérias associadas ($2,7 \times 10^6$ UFC) quando comparado com as demais cepas ($3,9 \times 10^5$ UFC) e a cepa *Salmonella* Typhimurium C20 (Gráfico 2).

O índice médio de invasão observado (População intracelular/população total x 100) variou de 5,3 a 13,1% após 3 h de interação. No entanto, a análise estatística demonstrou que a variação nos índices de invasão não foi significativa entre a maioria das cepas, exceto a cepa canina 2.3, do sorotipo O51:H40, que apresentou índice de invasão significativamente inferior quando comparado com a cepa humana de mesmo sorotipo (H1), bem como com as demais cepas humanas, além das cepas caninas 41.5 (O4:H16) e 75 (O49:H10) (Tabela 4). Quando comparadas com a cepa *S. Typhimurium* C20, apenas as cepas caninas do sorotipo O51:H40 (2.3 e 21) apresentaram um índice de invasão significativamente inferior em ensaios com 3 h de interação (Tabela 4).

Gráfico 2 – Total de bactérias associadas (população extra e intracelular) em ensaios com tapetes polarizados da linhagem celular T84 após 3 horas de interação

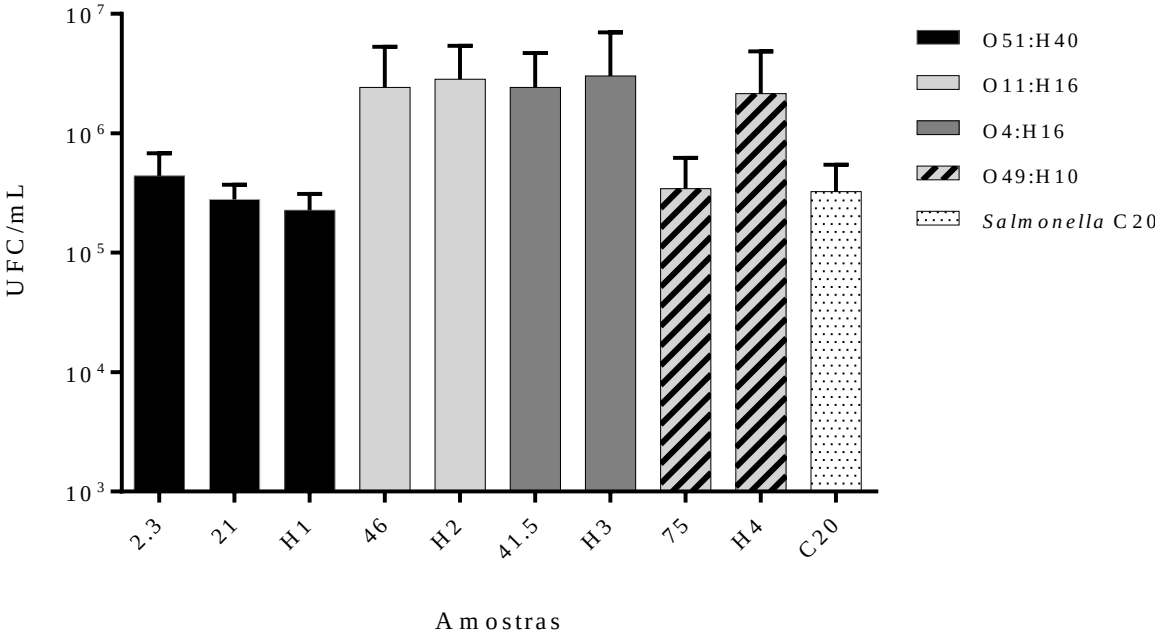
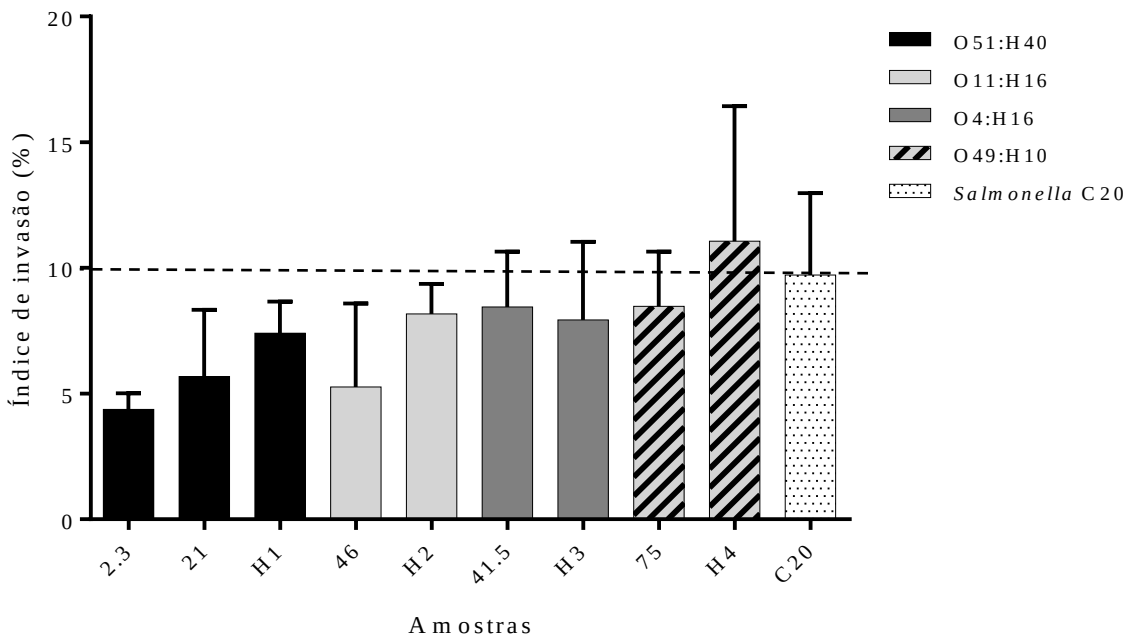


Gráfico 3 – Média do índice de invasão (%) apresentado pelas cepas aEPEC após três ensaios independentes, com 3 horas de interação, em tapetes polarizados da linhagem T84



Legendas: (---), índice de invasão apresentado pela cepa *Salmonella* Typhimurium C20.

Tabela 4 - Variação do percental de invasão entre as cepas caninas de humanas dos sorotipos O4:H16, O11:H16, O49:H10 e O51:H40

Sorotipo/ cepas		Sorotipo/amostras									C20
		O4:H16		O11:H16		O49:H10		O51:H40			
		41.5	H3	46	H2	75	H4	2.3	21	H1	
O4:H16	41.5		0,5779	0,1530	0,4810	0,6810	0,6102	0,0032	0,0598	0,1149	0,8264
	H3	0,5779		0,3663	0,9090	0,8195	0,4307	0,0352	0,2231	0,6087	0,4737
O11:H16	46	0,1530	0,3663		0,2268	0,2379	0,1865	0,4172	0,9900	0,2866	0,1116
	H2	0,4810	0,9090	0,2268		0,8447	0,4127	0,0028	0,1120	0,2900	0,4674
O49:H10	75	0,6810	0,8195	0,2379	0,8447		0,4805	0,0078	0,1150	0,2996	0,5804
	H4	0,6102	0,4307	0,1865	0,4127	0,4805		0,0234	0,0751	0,1489	0,6672
O51:H40	2.3	0,0032	0,0352	0,4172	0,0028	0,0078	0,0234		0,3111	0,0032	0,0056
	21	0,0598	0,2231	0,9900	0,1120	0,1150	0,0751	0,3111		0,1712	0,0404
	H1	0,1149	0,6087	0,2866	0,2900	0,2996	0,1489	0,0032	0,1712		0,1338
C20		0,8264	0,4737	0,1116	0,4674	0,5804	0,6672	0,0056	0,0404	0,1338	

Legenda: Os valores em negrito correspondem a comparação entre as cepas caninas e humanas de igual sorotipo. Os valores em vermelho indicam índices de invasão significativamente diferentes ($P < 0,05$). C20, *S. Typhimurium* cepa C20.

3.7 Avaliação da sobrevivência e multiplicação intracelular em tapetes polarizados da linhagem T84 após 48 horas de interação.

Todas as cepas estudadas demonstraram a capacidade de sobreviver e persistir por até 48 h no interior de células da linhagem T84 após ensaios com tapetes polarizados (Gráfico 4). Observou-se, nas primeiras 24 h após a infecção, uma redução acentuada da população intracelular. Embora, após aplicação do teste *t* não pareado bicaudal, esta redução tenha sido significativa apenas para as cepas 46 ($P=0,0006$), H4 (0,0436) e 2.3 (0,0210) (Gráfico 4). No entanto, após 48 h as bactérias permaneceram viáveis, ocorrendo pouca variação na população, onde apenas a cepa H4 apresentou uma redução significativa ($P=0,0318$). Em alguns casos houve um ligeiro aumento no número bactérias viáveis entre os dois períodos de tempo (24 e 48 h), sugerindo a ocorrência de multiplicação dentro do compartimento intracelular (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Variação da população intracelular após os períodos de interação de 2h, 24h e 48h com tapetes polarizados da linhagem T84 nas cepas humanas e caninas do sorotipo O4:H16

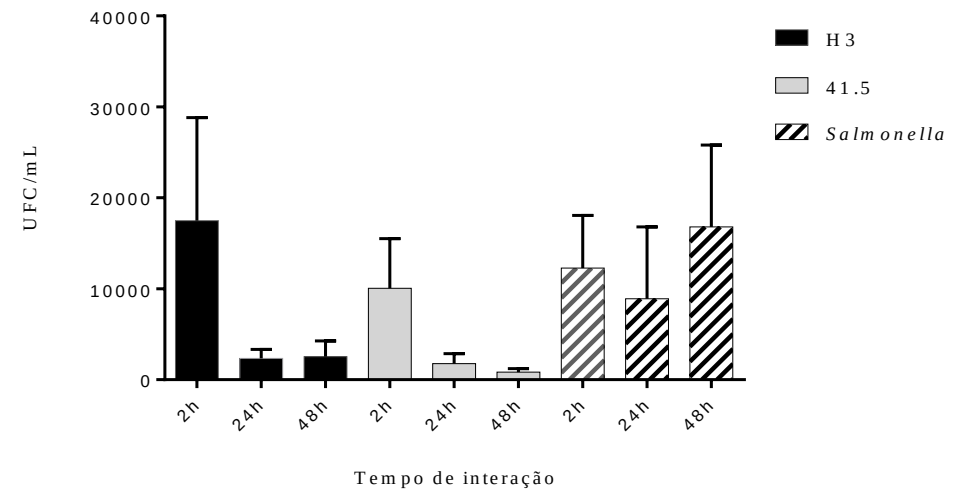
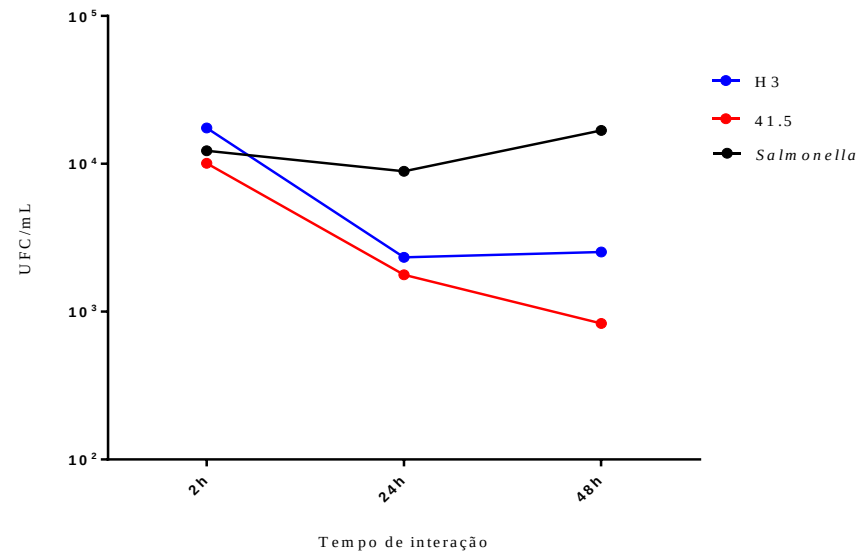
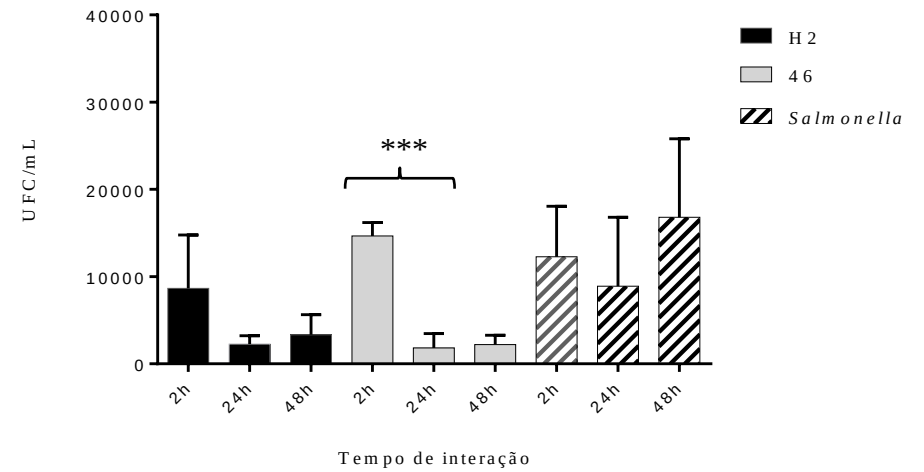
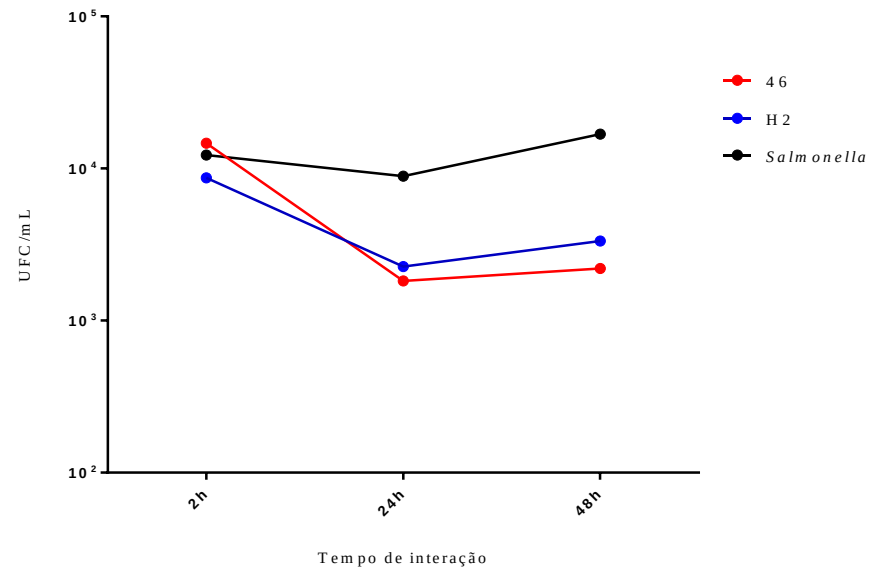
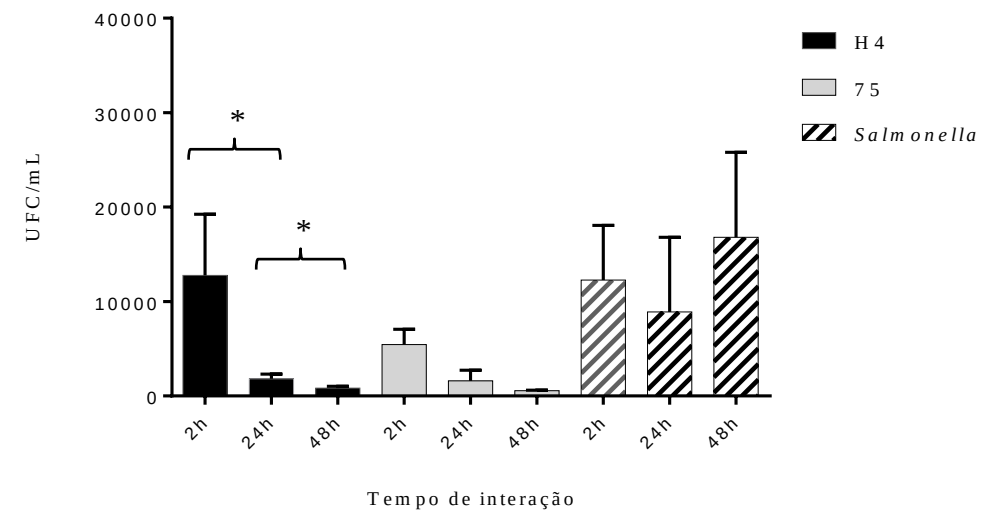
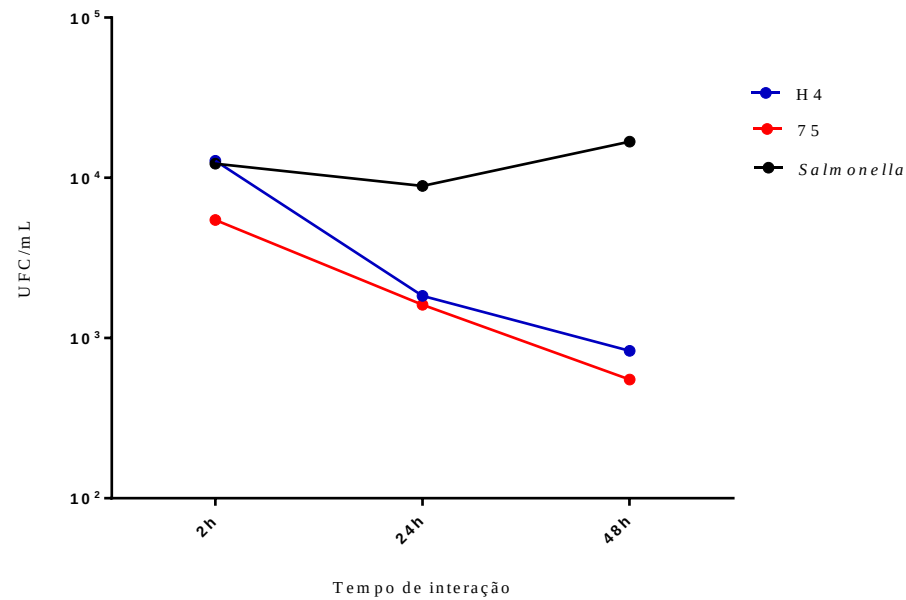


Gráfico 5 – Variação da população intracelular após os períodos de interação de 2h, 24h e 48h com tapetes polarizados da linhagem T84 nas cepas humanas e caninas do sorotipo O11:H16



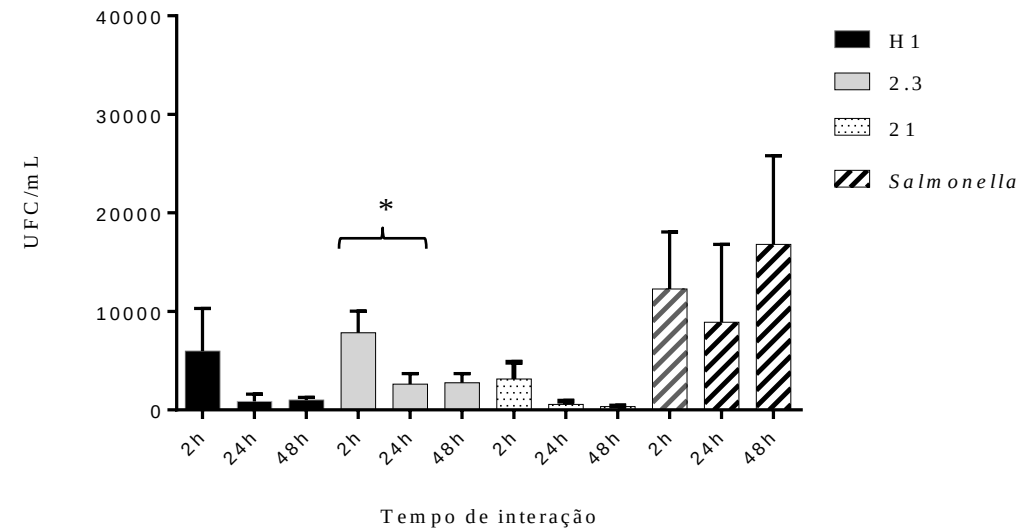
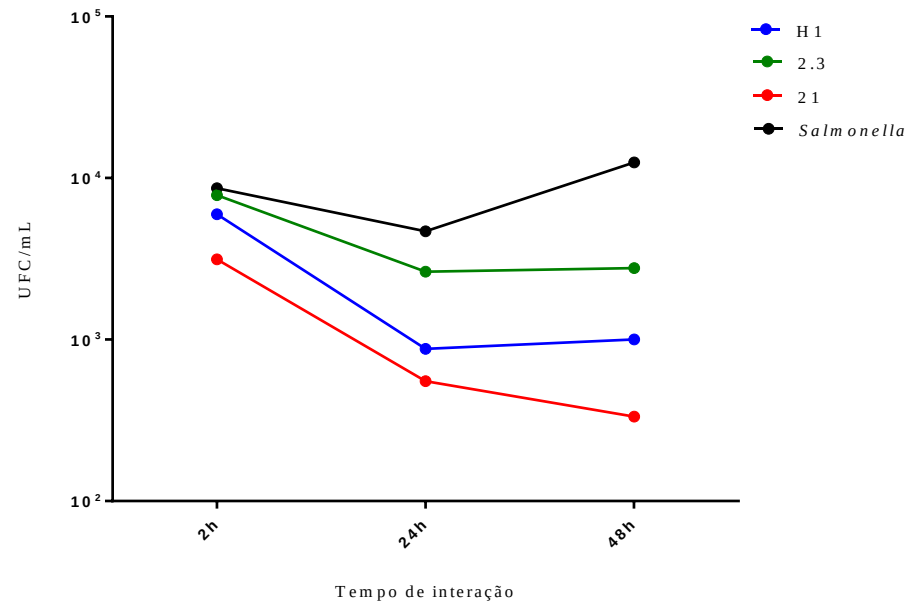
Legenda: ***, $P < 0,001$.

Gráfico 6 – Variação da população intracelular após os períodos de interação de 2h, 24h e 48h com tapetes polarizados da linhagem T84 nas cepas humanas e caninas do sorotipo O49:H10



Legenda: *, $P < 0,05$.

Gráfico 7 – Variação da população intracelular após os períodos de interação de 2h, 24h e 48h com tapetes polarizados da linhagem T84 nas cepas humanas e caninas do sorotipo O51:H40



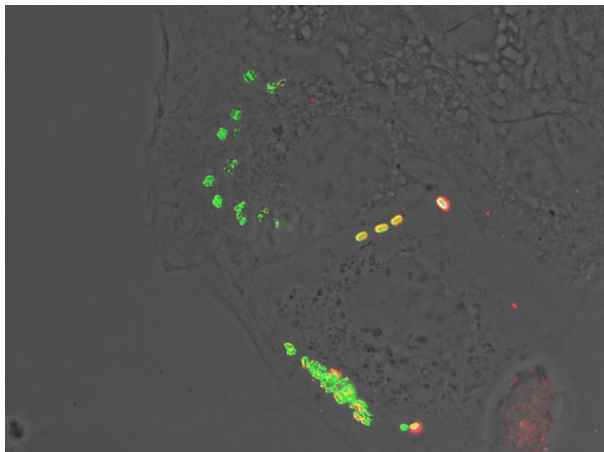
Legenda: *, $P < 0,05$.

3.8 Observação da invasão por microscopia de imunofluorescência

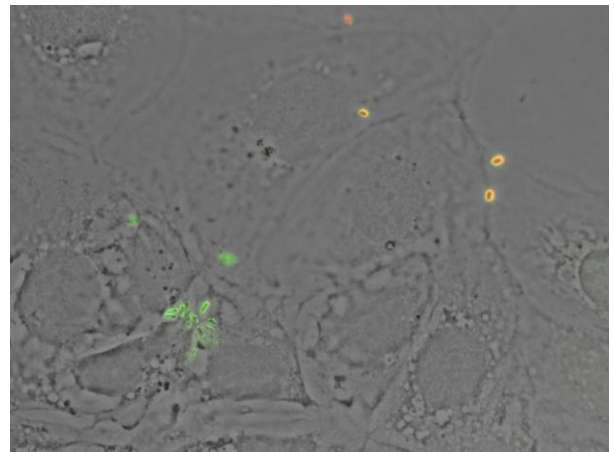
Os ensaios de dupla imunomarcção fluorescente para a observação da invasão em tapetes não confluentes de células da linhagem Caco-2 e T84 foi realizado com as cepas 2.3, 21 e H1, do sorotipo O51:H40, onde, por meio de microscopia de fluorescência e contraste de fase, foi possível visualizar a presença de bactérias no compartimento intracelular (marcadas em verde pelo anticorpo anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 488) em distinção às bactérias extracelulares (marcadas em vermelho/laranja com o conjugado Alexa 594). A localização intracelular se deu, predominantemente, ao longo da região marginal das células (membrana baso-lateral) após 3 h de interação (Figura 5). Tal achado ilustra a atividade invasora das cepas do sorotipo O51:H40, observada nos ensaios anteriores, inclusive reforçando que este comportamento é comum às cepas humanas e caninas.

Figura 5 – Imagem superposta (*merging*) de microscopia de fase e dupla imunofluorescência com células Caco-2 não confluentes infectadas pelas cepas 2.3 (A), 21 (B) e H1 (C) do sorotipo O51:H40, após 3 horas de interação. As bactérias foram tratadas com anticorpo (coelho) contra o antígeno O51, antes e após a permeabilização das células com Triton X-100. Usamos anticorpo secundário anti-IgG de coelho-Alexa 594 (vermelho) para marcar as bactérias extracelulares e anti-IgG-Alexa 488 (verde) para as bactérias intracelulares. Estas aparecem marcadas em verde e as extracelulares em laranja (verde+vermelho). 1000 x.

A)



B)



C)

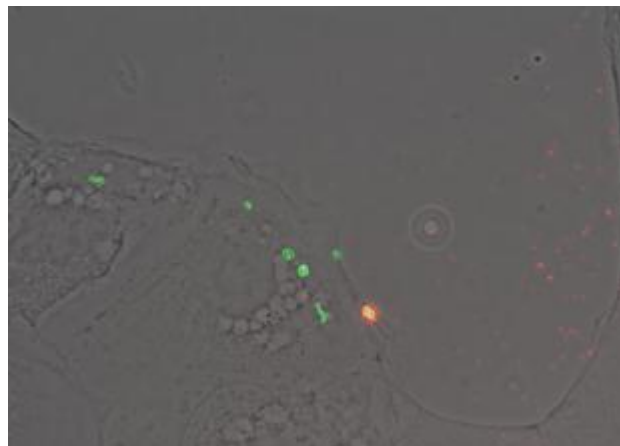
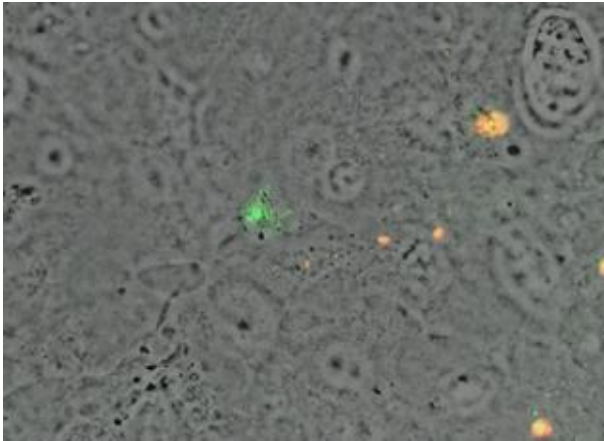
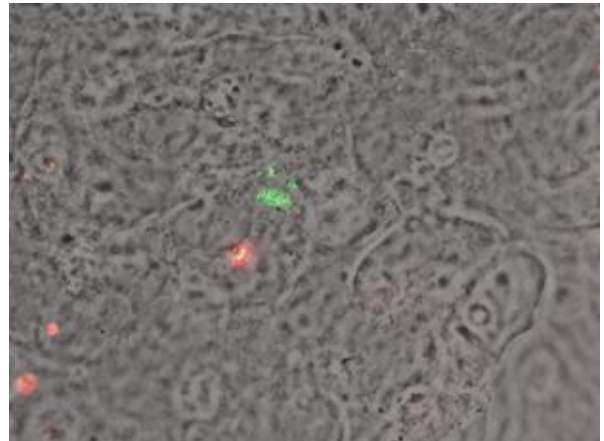


Figura 6 – Imagem superposta (*merging*) de microscopia de fase e dupla imunofluorescência com células T84 não confluentes infectadas pelas cepas 2.3 (A), 21 (B) e H1 (C) do sorotipo O51:H40, após 3 horas de interação. As bactérias foram tratadas com anticorpo (coelho) contra o antígeno O51, antes e após a permeabilização das células com Triton X-100. Usamos anticorpo secundário anti-IgG de coelho-Alexa 594 (vermelho) para marcar as bactérias extracelulares e anti-IgG-Alexa 488 (verde) para as bactérias intracelulares. Estas aparecem marcadas em verde e as extracelulares em laranja (verde+vermelho). 1000 x.

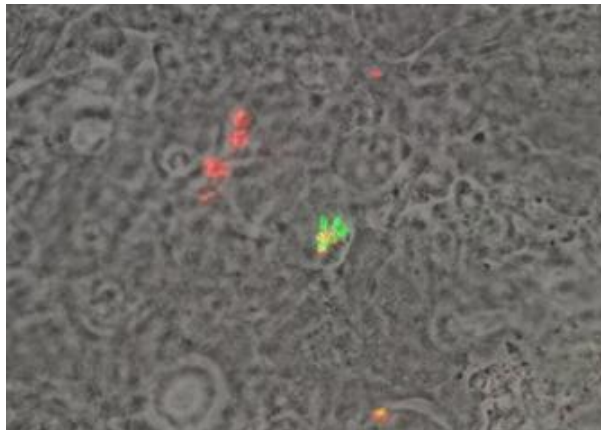
A)



B)



C)



4. DISCUSSÃO

Na última década observou-se um aumento do isolamento de cepas aEPEC nos países em desenvolvimento, cenário compartilhado com países desenvolvidos, onde muitas vezes observa-se uma associação destas bactérias com casos de diarreia infantil, caracterizando aEPEC como um patógeno intestinal emergente também nestas regiões (Contreras, 2011). Contudo, este panorama é mais relevante em países e regiões onde as condições sanitárias são precárias e o acesso à serviços de saúde é ainda deficiente. Assim, casos de diarreia aguda em crianças, em especial nas que já possuem uma complicação de base como a desnutrição, podem representar um risco de vida.

Embora cepas aEPEC sejam categorizadas pela presença do locus LEE e ausência do plasmídeo pEAF (comum em tEPEC) e dos genes *stx1* e *stx2*, os quais codificam os dois tipos de toxina Shiga presentes no patotipo STEC/EHEC, este grupo mostra-se muito heterogêneo e diverso em número de sorotipos, origem filogenética, hospedeiros e genes de virulência. Seu papel na doença humana ainda é controverso, uma vez que também é isolado frequentemente em indivíduos saudáveis, demonstrando uma adaptação ao hospedeiro, enfatizada na condição de portador assintomático (Hu & Torres, 2015). Contudo, diversas cepas e sorotipos apresentam uma série de genes de virulência frequentes em outros patotipos, como EHEC, tEPEC e ExPEC, que podem contribuir e/ou serem determinantes para o processo patogênico deste microrganismo, principalmente em indivíduos abaixo de 2 anos de idade, como ocorre com as tEPEC.

Diversos trabalhos procuraram avaliar a presença de fatores de virulência em cepas aEPEC associadas ou não à doença, tais como adesinas e fímbrias, toxinas e moléculas efetoras secretadas pelo T3SS (Afset *et al.*, 2006; Bugarel *et al.*, 2011; Hernandez *et al.*, 2011; Monaghan *et al.*, 2013; Salvador *et al.*, 2014; Scaletsky *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2010). Por outro lado, outros estudos focaram na interação de aEPEC com a célula hospedeira “*in vitro*” e “*in vivo*”, avaliando a capacidade de aderir, promover lesão A/E e invadir células intestinais (Sampaio *et al.*, 2009, 2011, 2014; Yamamoto *et al.*, 2009). Em um destes estudos Moreira *et al.* (2008) confirmaram o potencial patogênico de cepas humanas do sorotipo O51:H40, demonstrando sua capacidade em aderir a células intestinais e produzir lesão A/E.

Uma vez que cepas aEPEC são comumente encontradas em diversas espécies animais, como os cães, a caracterização de cepas animais que apresentem um perfil genético e um comportamento patogênico similar às cepas associadas à doença humana pode auxiliar na

identificação de clones com potencial zoonótico. No presente estudo, cepas aEPEC isoladas de filhotes de cães com sintomas de diarreia pertencentes a sorotipos previamente isolados de casos humanos no Brasil, foram avaliadas quanto a presença de genes de virulência, a similaridade genética com cepas humanas de mesmo sorotipo e a interação com células intestinais “*in vitro*”, como forma de averiguar a capacidade patogênica destas cepas e definir o cão como reservatório potencial em uma transmissão desta bactéria ao homem.

Dos genes *espP*, *ehxA* e *toxB*, associados a o plasmídeo pO157, apenas o último foi detectado nas cepas do sorotipo O49:H10 (amostras H4 e 75). Além destes genes, não foi detectada a ocorrência dos genes *iha*, *saa* e *paa*. Scaletsky *et al.* (2010) identificaram a ocorrência do gene *toxB* em diversas cepas de aEPEC, principalmente do sorogrupo O26. Em outro estudo, Gomes *et al.* (2011) também descreveram a presença deste gene em cepas aEPEC, inclusive do sorotipo O49:H10. No entanto, em ambos os estudos não foi possível associar a presença do *toxB* em cepas aEPEC à casos de diarreia. A presença do gene *toxB* em cepas aEPEC suscita a hipótese de parentesco com cepas STEC/EHEC. Alguns estudos descreveram a ocorrência de cepas STEC pertencentes ao sorogrupo O49 em ovelhas (Blanco *et al.*, 2003), gado bovino (Blanco *et al.*, 2004) e suínos (Tseng *et al.*, 2014).

O gene *ecpA*, que codifica a subunidade principal do pilus ECP (*E. coli* common pilus) foi detectado em todas as amostras pesquisadas. Rendón *et al.* (2007) levantaram a hipótese de que o ECP é um atributo comum em *E.coli*, conservado entre as linhagens por representar um mecanismo de colonização de diferentes hospedeiros e tecidos. Em EPEC o pili ECP parece atuar como um fator acessório que contribui no complexo processo multifatorial de interação com a célula hospedeira. Saldaña *et al.* (2009) destacaram a atuação conjunta do ECP com o BFP na formação do fenótipo de aderência localizada por tEPEC. De maneira similar, o pili ECP deve auxiliar no processo, ainda não totalmente elucidado, de aderência das cepas aEPEC à célula hospedeira.

O gene *hcpA* foi detectado em cinco cepas: três do sorotipo O51:H40, duas caninas (amostras 2.3, 21) e uma humana (H5), além das amostras humanas H3 (O4:H16) e H4 (O49:H10). Inicialmente, Xicohtencatl-Cortes *et al.* (2007) associaram este pili à capacidade da cepa EHEC EDL933 (sorotipo O157:H7) em aderir ao epitélio intestinal de humanos e bovinos. Em trabalhos subsequentes, além do papel na aderência, o HCP foi associado à invasão de células epiteliais, formação de biofilme, adesão a matriz extracelular, “*twitching motility*” e estimulação da produção de IL-8 e TNF- α (Ledesma *et al.*, 2010; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009).

A região dos genes *csgBA* foi amplificada em todas as cepas estudadas, demonstrando a presença do operon *csgBAC*, responsável pela produção das fibras amilódes. Além disso, a expressão da fímbria curli foi observada em todas as cepas por meio de semeadura em CRA, o que indiretamente indica a presença do operon *csgDEFG*, pois o gene *csgD* tem papel de regulador da expressão do operon *csgBAC* (Smith *et al.*, 2017). Em contraponto aos nossos achados, Hernandez *et al.* (2011) observaram a presença do gene *csgA* em somente 19,7% das cepas aEPEC estudadas, onde apenas 2,8% demonstrou a expressão de curli em meio CRA após crescimento por uma noite. Em outro estudo (Nascimento *et al.*, 2014), a ocorrência do gene *csgA* em cepas aEPEC produtoras de biofilme foi de 46%, sendo 47% destas cepas produtoras de fímbria curli a 26°C, em contraste com 82% a 37°C, em meio CRA após 24 h de incubação. Possivelmente, um tempo maior de incubação (48 h) poderia favorecer a visualizaçãoda produção de curli em meios acrescidos de vermelho congo, como citam alguns autores (Bak *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2017). A expressão de fímbria do tipo 1 (T1F) em ensaios de aglutinação de leveduras, observada em quase todas as cepas que amplificaram o gene *fimH* em estudo anterior (dados não publicados), confirma a presença do operon funcional nestas cepas. Esta fímbria é reconhecidamente associada à formação de biofilme e a uropatogênese em cepas de *E. coli* (Stærk *et al.*, 2016), embora também desempenhe papel auxiliar na aderência e colonização dos enterócitos em cepas diarreio gênicas.

Hernandes *et al.* (2011) pesquisaram a ocorrência de genes que codificam adesinas fimbriais em 71 cepas aEPEC de crianças com diarreia (54) e indivíduos saudáveis (17), detectando a presença do gene *ecpA* em 61 cepas (86%) e do gene *hcpA* em 70 cepas (98,6%). Embora os autores não tenham demonstrado a expressão do pili HCP por imunofluorescência, a expressão da fímbria ECP foi evidenciada em 36,6% das cepas em ensaios com células HeLa, sugerindo que esta fímbria pode desempenhar um papel acessório na adesão celular em cepas aEPEC. Ledesma *et al.* (2010) observaram a expressão da pili HCP apenas em meio mínimo Minca (formulação segundo Guinee *et al.*, 1976) e não em CFA ágar, TSB, LB, Mueller Hinton ou DMEM, levando a crer que a expressão de HCP “*in vitro*” parece ser regulada por fatores nutricionais.

Em trabalho recente, Munhoz *et al.* (2018) demonstraram a ocorrência de diferentes genes fimbriais em aEPEC e, embora não tenham observado correlação com o padrão de aderência em células HEp-2, destacaram a alta prevalência das fímbrias ECP, HCP e T1F, sugerindo que estas desempenhem um importante papel na adesão à célula hospedeira.

A avaliação da presença de 16 genes cromossômicos localizados fora do locus LEE que codificam moléculas efetoras secretadas pelo T3SS, conhecidos como “*non-LEE*

effectors” (NLEs), permitiu observar diferentes arranjos destes genes dentro do grupo de amostras. Sabendo-se que o repertório de NLE é variável em patógenos A/E (Afset *et al.*, 2006; Coombes *et al.*, 2008; Salvador *et al.*, 2014), nossos resultados ilustram a ampla diversidade genética presente em aEPEC. Embora não se conheça ainda o papel de alguns efetores na patogênese, outros, como o NleA e NleB, parecem ser essenciais para a virulência deste grupo de patógenos (García-Angulo *et al.*, 2012).

O repertório de genes *nle* é utilizado como marcador para a avaliação do risco molecular (“*molecular risk assessment*” [MRA]), termo utilizado para identificar o potencial patogênico de uma cepa e, com isso, a severidade da doença. Neste sentido, Coombes *et al.* (2008), buscando associar o conjunto de genes *nle* em cepas STEC não-O157 com a severidade dos sintomas clínicos, observaram que os genes *nle* estão presentes significativamente em maior número em cepas relacionadas a surtos e casos de HUS. De maneira similar, a presença de alguns destes genes, como o *nleB* e o *nleE*, foi mais frequente em cepas aEPEC associadas à diarreia (Afset *et al.*, 2006). Vieira *et al.* (2010) observaram uma estreita associação entre a presença da PAI O122 íntegra e diarreia em cepas aEPEC. Esta ilha de patogenicidade contém os genes *efa1*, que codifica uma adesina descrita em EHEC (similar ao gene *lifA* em EPEC), além dos genes NLE: *nleB*, *nleE* e *espL*.

As cepas caninas apresentaram um perfil de genes *nle* similar ao observado nas cepas humanas do mesmo sorotipo, incluindo a presença dos genes *nleB* e *nleE*, associados à PAI O122, nos sorotipos O51:H40 (amostras 2.3 e 21) e O4:H16 (41.5). Interessantemente, destaca-se a amostra 41.5 (O4:H16) que apresentou os genes *efa-1*, *nleF* e *nleH1-2*, estes dois últimos ausentes na cepa do mesmo sorotipo isolada de criança (H3). Muitos dos efetores NLE estão associados à modulação da resposta imune do hospedeiro, fator crucial para o sucesso da infecção. A proteína NleB está envolvida na inibição da sinalização de morte celular; enquanto que NleE, parece interferir na sinalização via NF- κ B e no reparo de DNA. NleF e NleH1-2 também foram associadas à inibição de morte celular e da resposta inflamatória. Uma visão geral destas moléculas efetoras foi revisada recentemente por Pearson *et al.* (2016). Também recentemente, Cepeda-Molero *et al.* (2017) demonstraram que a interação intimina-Tir não é, por si só, suficiente para o desenvolvimento da lesão A/E em ensaios “*in vitro*” com tecido da mucosa intestinal humana (IVOC). Estes autores trabalharam com mutantes da cepa tEPEC E2348/69 defectivos em regiões cromossômicas que abrigam efetores NLE (integrans e prófagos) e concluíram que estes genes desempenham um papel chave na dinâmica da interação bactéria-célula hospedeira para a formação da lesão A/E.

Embora haja uma ampla diversidade genética entre as cepas aEPEC, refletida na miríade de combinações de genes de virulência, a presença dos genes *nle* parece estar associada ao evento de aquisição do locus LEE por transferência horizontal. Ingle *et al.* (2016) analisaram 359 genomas completos de *E. coli* (258 aEPEC e 101 de outros patotipos como tEPEC e EHEC) e identificaram 30 subtipos de locus LEE, cada qual associado a presença de um repertório de genes *nle* compatível, demonstrando que estas regiões gênicas co-evoluíram e provavelmente são transferidas juntas como ilhas de patogenicidade, como a PAI O122 que flanqueia alguns subtipos de LEE. Desta forma, a presença de um conjunto de genes *nle* similar nas cepas caninas e humanas de mesmo sorotipo é um indicativo que estas cepas compartilham do evento de aquisição do locus LEE por um ancestral comum.

A relação filogenética entre estas cepas foi observada por meio da técnica de MLST, que identificou a ocorrência do ST10 (nas cepas caninas e humanas dos sorotipos O4:H16, O11:H16 e O51:H40) e do ST206 (nas cepas do sorotipo O49:H10). Ambos STs foram descritos em um estudo recente onde os autores analisaram 1.196 cepas de *E. coli* diarreio gênicas (DEC) humanas, isoladas em 44 países de quatro continentes, com o ST10, e o complexo clonal 10 (CC10) como um todo, predominando sobre os demais STs (Yu *et al.*, 2018). Neste mesmo trabalho, observou-se a associação de diferentes patotipos (ex. EPEC, EAEC, ETEC e ExPEC) com o ST10, caracterizando este ST como um grupo filogeneticamente diverso e com distribuição mundial (Yu *et al.*, 2018).

Recentemente, tanto o ST10 quanto o ST206, foram associados a cepas multirresistentes na China e no Sultanato de Omã, albergando o gene plasmidial *mcr-1*, responsável pela resistência a colistina (Mohsin *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017). Além disso, o ST10 já foi descrito em cepas associadas a infecções do trato urinário (UPEC) em humanos (Gibreel *et al.*, 2012; Nüesch-Inderbinnen *et al.*, 2017), em muitos casos acompanhando o ST131, que atualmente desempenha um papel de destaque nestas infecções (Pitout & Devinney, 2017). Outro estudo na China identificou o ST131, seguido do ST10, em quase 50% do total de cepas extraintestinais resistentes a cefalosporina (ESC-R) isoladas de infecções em cães, evidenciando seu papel como patógeno também nesta espécie (Liu *et al.*, 2016).

Em outros estudos, o ST10 foi o mais comum, sendo identificado em cepas isoladas de humanos e alimentos de base animal no Canadá e em suínos na Dinamarca (Ahmed *et al.*, 2017; Manges *et al.*, 2015). No Brasil, Maluta *et al.* (2014) identificaram o ST10 e o ST206 em cepas isoladas de aves (APEC) e cepas extraintestinais (ExPEC) provenientes de casos de bacteremia e infecções do trato urinário.

Todos estes trabalhos evidenciam a grande diversidade dentro destes dois STs, em especial o ST10, sendo associados a diferentes sorotipos, patotipos, doenças, hospedeiros e fontes de transmissão. No contexto do presente estudo, a ocorrência destes STs em cepas humanas e caninas de aEPEC aponta para a diversidade e a ubiquidade deste grupo e seu potencial patogênico, uma vez que são frequentemente associados aos diferentes espectros de doença. Somado a isso, a análise filogenética das sequências dos genes “housekeeping” concatenados demonstrou uma maior proximidade genética entre os STs 10 e 206 e outros STs associados aos sorotipos de STEC/EHEC, que compõem o grupo comumente denominado de “top five”, quando comparados com a cepa típica EPEC E2348/69 do sorotipo O127:H6. Neste sentido, destaca-se o ST206 (sorotipo O49:H10), agrupado junto aos STs 16 (O111:H8), 17 (O103:H2) e 21 (O26:H11). As cepas canina e humana deste ST amplificaram para os subtipos de intimina β (β 1), comum à cepas STEC O26:H11, e sua variante δ (β 2), já descrita anteriormente em cepas EPEC do mesmo sorotipo (Oswald *et al.*, 2000).

A análise dos perfis de macrorrestrição com a enzima XbaI, após eletroforese em campo pulsado (PFGE), permitiu claramente observar uma divisão entre as cepas dos STs 10 e 206, com o pareamento das cepas do mesmo sorotipo. No entanto, não foi observada a ocorrência de clones entre as cepas caninas e humanas, fato este já esperado em função da ausência de associação epidemiológica entre as cepas. O compartilhamento de clones de *E.coli* entre cães de companhia e seus proprietários foi observado em diversos estudos, por meio do PFGE e de outras técnicas de “fingerprint” como o RAPD e o ERIC PCR (“*Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR*”) (Carvalho *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2017; Harada *et al.*, 2012; Naziri *et al.*, 2016). Moura *et al.* (2009) demonstraram que cepas aEPEC de igual sorotipo, associadas a diarreia e oriundas de fontes animal (incluindo cães) e humana, podem apresentar o mesmo ST e um perfil de PFGE similar.

Neste sentido, nossos achados corroboram com a hipótese de que cepas de *E. coli* do patotipo aEPEC circulam entre o homem e os cães de companhia (e vice-versa), não permitindo um distanciamento genético vultoso entre si. Como resultado disso, cepas aEPEC caninas, principalmente de sorotipos e/ou linhagens já associados a doença humana, podem albergar uma gama de genes de virulência localizados fora do locus LEE e que codificam adesinas, toxinas e outros efetores, capacitando estas cepas como potenciais agentes zoonóticos.

A ocorrência de cepas aEPEC geneticamente similares associadas à diarreia entre cães e humanos, tema dos parágrafos acima, é, por si só, uma evidência do papel destes animais como reservatório de cepas potencialmente patogênicas ao homem. Contudo, a expressão

desta capacidade patogênica nas cepas animais, que configura o risco real da aquisição destes patógenos para a saúde humana, é ainda um desafio. Neste trabalho também foi avaliada a capacidade das cepas caninas e humanas de igual sorotipo, em aderir, invadir e sobreviver no ambiente intracelular de enterócitos humanos, por meio de ensaios “*in vitro*” em cultura de células.

Segundo dados obtidos anteriormente por Almeida *et al.* (2012), as cepas caninas utilizadas neste estudo apresentaram a capacidade de aderir às células HeLa, com acumulação de actina no sítio da adesão (fenômeno evidenciado através do teste FAS), indicando a expressão do T3SS com concomitante formação de lesão A/E. Além disso, nosso grupo também observou nestas cepas a expressão do fenótipo de aderência LAL em células Caco-2 (dados não publicados). O fenótipo de aderência em células epiteliais é um indicativo da expressão de determinados fatores de virulência, sendo ainda hoje uma importante ferramenta na identificação dos patotipos associados as *E. coli* diarreiogênicas (Gomes *et al.*, 2016). No presente trabalho, a avaliação do fenótipo de aderência em tapetes não confluentes de células HEp-2 e polarizados da linhagem T84, após 6 h de interação, permitiu observar o padrão o LAL em todas as cepas, com a adesão das bactérias preferencialmente nas regiões de borda do tapete em T84. Este padrão de aderência é bastante comum em cepas aEPEC, sendo associado a atuação de diferentes adesinas, como a intimina e o ECP, dentre outras (Scaletsky *et al.*, 2010).

Nos últimos vinte anos diversos estudos evidenciaram o potencial de cepas aEPEC em aderir, formar lesão A/E e invadir células epiteliais, incluindo as linhagens intestinais Caco-2 e T84 (Moreira *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2014; Pelayo *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2001; Sampaio *et al.*, 2009, 2011, 2014, 2016; Yamamoto *et al.*, 2009), com destaque para o sorotipo O51:H40, associado a diarreia infantil no Brasil (Gomes *et al.*, 2004). Após ensaios para quantificação da invasão em tapetes das linhagens Caco-2 e T84 (realizados com as cepas do sorotipo O51:H40), foi observada uma redução estatisticamente significativa da invasão em tapetes polarizados da linhagem Caco-2 quando comparado com tapetes não confluentes. No entanto, para a linhagem T84, apenas a cepa 2.3 apresentou uma significativa redução no índice de invasão entre os dois tipos de tapete. Desta forma, embora as cepas do sorotipo O51:H40 tenham sido capazes de invadir ambas as linhagens celulares, fenômeno também observado por meio de microscopia de imunofluorescência, a invasão de tapetes polarizados, ou seja, com menor exposição da região basolateral, foi mais eficiente na linhagem T84, levando à adoção deste modelo para as demais cepas. Sampaio *et al.* (2011), contudo, observaram um índice de invasão significativamente maior em uma cepa aEPEC do

sorotipo O51:H40, comparado com uma cepa aEPEC ONT:HNT e a cepa tEPEC O127:H6 (2348/69), em ensaios com tapetes polarizados das linhagens Caco-2 (14,8%, 1,4% e 3,2%, respectivamente) e T84 (4,8%, 0,2% e 1,8%, respectivamente), onde, por meio de MET, visualizaram a presença de bactérias em vacúolos na região basolateral. Comparativamente, o índice de invasão observado no presente estudo para as cepas do sorotipo O51:H40 variaram de 0,5 a 5,1% em tapetes polarizados da linhagem Caco-2 e de 4,1 a 8,0% para T84, demonstrando haver uma flutuação no potencial invasivo entre as cepas deste sorotipo.

Os ensaios realizados com as cepas caninas e humanas dos outros três sorotipos (O4:H16, O11:H16 e O49:H10), também utilizando o modelo de 3 h de interação com tapetes polarizados da linhagem T84, evidenciaram uma capacidade invasora em todas, não sendo observado, na maioria dos casos, diferenças significativas nos índices de invasão entre as cepas caninas e humanas, entre os diferentes sorotipos e entre as cepas aEPEC e *S. Typhimurium* C20. Apenas a cepa canina 2.3, do sorotipo O51:H40, apresentou índice de invasão significativamente inferior quando comparada com a maioria das outras cepas. Yamamoto *et al.* (2009) haviam observado a capacidade de invadir células da linhagem T84 em cepas aEPEC de diferentes sorotipos com subtipos incomuns do gene *eae*, sugerindo que cepas aEPEC podem invadir células intestinais “*in vitro*” independente do subtipo de intimina. Em nosso estudo, utilizou-se cepas caninas e humanas dos sorotipos O4:H16, O11:H16 e O49:H10, do subtipo *eae*- β , e do sorotipo O51:H40, subtipo *eae*- γ .

Estes achados vão de encontro ao observado na literatura, reforçando a capacidade apresentada por algumas cepas aEPEC de invadir enterócitos *in vitro*. Inclusive, com este comportamento não se restringindo a cepas humanas, sendo também observado em cepas caninas de igual sorotipo.

A elucidação dos mecanismos envolvidos nos processos de aderência e invasão à mucosa intestinal por cepas aEPEC ainda resta por ser estabelecida. No entanto, alguns autores identificaram que o flagelo (Sampaio *et al.*, 2009, 2016) e o T3SS (Sampaio *et al.*, 2014) desempenham um papel fundamental na interação com o enterócito “*in vitro*” em cepas aEPEC do sorotipo O51:H40, uma vez que mutantes $\Delta fliC$ e $\Delta escN$ apresentam significativa redução na capacidade de aderir e invadir, quando comparados com a cepa selvagem. Além disso, Moraes *et al.* (2015) sugerem que a flagelina e uma chaperonina (GroEL) atuam em conjunto na ligação à fibronectina da matriz extracelular em cepas aEPEC (O26:H11), iniciando o processo de adesão e colonização do epitélio intestinal.

A invasão de células intestinais por algumas cepas aEPEC ocorre mais eficientemente pela região basolateral, uma vez que o tratamento de tapetes polarizados com EGTA (ácido

etileno glicol tetracético), que atua rompendo as junções oclusivas e consequentemente expondo a região basolateral, promove um aumento da invasão por estas bactérias, fenômeno também observado em cepas STEC e em *S. flexneri* (Cordeiro *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2009). Neste contexto, os tapetes pós-confluentes das linhagens Caco-2 e T84 atuam como enterócitos “*in vitro*”, onde sofrem um processo de diferenciação que leva a formação das junções de oclusão (do inglês “*tight junctions*”) e consequente polarização em dois domínios: membrana apical e basolateral. Estas mudanças mimetizam o processo de diferenciação das células do epitélio intestinal durante a migração das células de cripta para as vilosidades. Em contrapartida, tapetes não confluentes são principalmente formados por células não diferenciadas, permitindo o livre acesso das adesinas e invasinas bacterianas a receptores típicos da região basolateral (Rosa *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2009).

Recentemente, Pedersen *et al.* (2017) observaram que a cepa tEPEC E2348/69 (O127:H6) se adere nas regiões de união entre as células, preferencialmente nas junções oclusivas entre três células, onde se multiplicam e formam microcolônias. Além disso, estes autores constataram que a bactéria manipula a célula hospedeira, promovendo um rearranjo da maquinaria do citoesqueleto, seguido do redirecionamento do fluxo de vesículas e consequente acúmulo de proteínas de membrana basolateral na região apical, no entorno da microcolônia. Uma vez que cepas aEPEC também aderem e interagem com o citoesqueleto através de efetores do T3SS (inclusive através da ligação intimina-Tir), formando estruturas em pedestal, o mesmo fenômeno de transição das proteínas de membrana pode ocorrer, o que favoreceria a invasão dos enterócitos nesta região apical de borda. Naturalmente, novos estudos precisam ser conduzidos a fim de evidenciar este comportamento nas cepas aEPEC. Alguns efetores secretados via T3SS já foram associados com a alteração da permeabilidade seletiva da membrana e ruptura das junções oclusivas (como o EspF, Map, NleA e EspG), um fenômeno associado ao desenvolvimento do quadro diarreico, que, secundariamente, pode auxiliar no processo de invasão pela exposição da região basolateral (Glotfelty *et al.*, 2014; Mcnamara *et al.*, 2001; Peralta-Ramírez *et al.*, 2008; Tapia *et al.*, 2017; Weflen *et al.*, 2010). Além disso, “*in vivo*” estes patógenos também podem acessar a região basolateral dos enterócitos por meio de transcitose via células M (Grützku *et al.*, 1990) e/ou através de perturbações na estrutura da mucosa intestinal, como a migração de neutrófilos para o tecido inflamado (McCormick *et al.*, 1998).

Além da capacidade de invadir enterócitos, a sobrevivência no interior destas células foi observada após exposição a tapetes polarizados da linhagem T84, onde todas as cepas, caninas e humanas, foram capazes de sobreviver após 48 h de interação. A invasão,

sobrevivência e multiplicação intracelular já foi observada anteriormente em cepas aEPEC, na linhagem T84 (Sampaio *et al.*, 2011) e em células Caco-2 (Pacheco *et al.*, 2014), demonstrando a capacidade de algumas cepas, inclusive do sorotipo O51:H40, de permanecerem viáveis no interior de enterócitos “*in vitro*”. Em outro trabalho, Cordeiro *et al.* (2013) observaram um comportamento similar em cepas STEC, as quais persistem e se multiplicam no interior de células Caco-2 por mais de 96 h sem levar a morte do enterócito, diferentemente da *Salmonella* Typhimurium, que destrói o tapete completamente após 48 h.

No presente estudo, observou-se um comportamento homogêneo entre as cepas aEPEC estudadas, com uma nítida redução na população intracelular após as primeiras 24 h de interação, seguida de uma variação mais sutil após as 24 h seguintes, com manutenção da população intracelular e provável equilíbrio entre morte e multiplicação bacteriana. Em contraste, como esperado, a cepa *S. Typhimurium* C20 apresentou um aumento na população após 48 h. Notadamente, este comportamento invasivo em aEPEC não configura um mecanismo de agressão propriamente dito, como ocorre em *Salmonella*, e sim uma estratégia de evasão do sistema imune e persistência no hospedeiro, o que poderia levar a um aumento do período de eliminação fecal, favorecendo a transmissão. No entanto, Sampaio *et al.* (2014), sugerem que, em casos específicos, como imunossupressão, antibióticoterapia, obstrução das vias biliares dentre outros processos que causam alteração da microbiota intestinal, cepas aEPEC, teoricamente um patógeno restrito a mucosa intestinal, têm a capacidade de atravessar a barreira intestinal e ganhar acesso a outros sítios de infecção extraintestinais.

No contexto do presente trabalho, a observação de um comportamento invasivo em células intestinais humanas por cepas aEPEC caninas indica uma adaptação ao hospedeiro humano e sugere que este comportamento também possa ocorrer no hospedeiro animal, fato que favoreceria a colonização persistente e a condição de reservatório zoonótico.

Em suma, os resultados obtidos demonstraram que cepas aEPEC de igual sorotipo, embora isoladas de diferentes espécies, no caso cães filhotes e crianças, ambos sem associação epidemiológica e com sinal clínico de diarreia, compartilham o mesmo ST e são similares quanto a presença de genes de virulência e quanto ao perfil de macrorestrição por PFGE. Além disso, ensaios de interação “*in vitro*” com tapetes celulares de enterócitos humanos da linhagem T84 evidenciaram, em todos os sorotipos, tanto de origem canina quanto humana, uma capacidade de aderir, invadir e sobreviver no interior destas células após 48 h. Estes achados indicam que cães carregam cepas aEPEC potencialmente patogênicas ao homem, que em condições sanitária e de higiene não adequadas, podem ser transmitidas a uma população susceptível, principalmente crianças com menos de 2 anos, estabelecendo um

quadro infeccioso. Somado a isso, o fato de cepas aEPEC também atuarem como agente etiológico de diarreia em cães filhotes potencializa o risco de eliminação e contaminação dos ambientes coabitados pelos dois hospedeiros.

CONCLUSÃO

Tendo por base os resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que cepas do patotipo aEPEC de igual sorotipo, porém isoladas de episódios de diarreia em diferentes hospedeiros (homem e cão), compartilham características de virulência e filogenética, além de apresentarem comportamento similar quanto à interação com células intestinais humanas em cultura. Estes achados sugerem um papel de patógeno potencialmente zoonótico às cepas aEPEC caninas dos sorotipos estudados. Tal conclusão alicerça-se em diferentes observações, onde se destaca, entre as cepas caninas e humanas de igual sorotipo: i) o compartilhamento dos genes de virulência, inclusive já associados à doença humana em cepas STEC/EPEC (*hcpA*, *efa-1*, *toxB* e *nleB*), ii) a observação do mesmo ST (ST10 e 206) e perfis semelhantes após macrodigestão por PFGE e iii) comportamento similar, fenótipo de aderência, invasão e persistência intracelular (>48 horas), em ensaios com cultura de células intestinais da linhagem T84. Assim, em acordo com os objetivos propostos, concluímos que cães filhotes, atuam como reservatório de cepas aEPEC potencialmente patogênicas, que, em condições higiênico-sanitárias inadequadas, podem ser transmitidas a uma população susceptível, em especial crianças com menos de dois anos de idade, e desencadear um quadro infeccioso de diarreia.

REFERÊNCIAS

- Abe CM, Trabulsi LR, Blanco J, Blanco M, Dahbi G, Blanco JE, Mora A, Franzolin MR, Taddei CR, Martinez MB, Piazza RM, Elias WP. Virulence features of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae* (+) EAF-negative *stx* (-) genetic profile. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; Aug 64(4):357-65.
- Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S, Dougan G. Detection of intimins α , β , γ and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol*. 1998 Mar; 36(3):662-8.
- Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *J Med Microbiol*. 2004;53(11):1137-44.
- Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, Bergh K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J Clin Microbiol*. 2006;44(10):3703-11.
- Ahmed S, Olsen JE, Herrero-Fresno A. The genetic diversity of commensal *Escherichia coli* strains isolated from non-antimicrobial treated pigs varies according to age group. Moreno-Hagelsieb G, editor. *PLoS One*. 2017;12(5):1-18.
- Almeida PMP, Arais LR, Andrade JRC, Prado EHRB, Irino K, Cerqueira AMF. Characterization of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from dogs. *Vet Microbiol*. 2012 Aug 17;158(3-4):420-4.
- Alnajar S, Gupta RS. Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family Enterobacteriaceae and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. *Infect Genet Evol*. 2017;54:108-27.
- Álvarez-Suárez ME, Otero A, García-López ML, Dahbi G, Blanco M, Mora A, Blanco J, Santos JA. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *Int J Food Microbiol*. 2016;236:148-54.
- Arais LR. Caracterização genotípica e fenotípica de *Escherichia coli* Enteropatogênica atípica isolada de cães e de humanos. Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em microbiologia e parasitologia aplicadas. 2010. Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói.
- Bak G, Lee JYJ, Suk S, Kim D, Lee JYJ, Kim K, Choi BS, Lee Y. Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility, and fimbriae formation in *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2015;5:15287.
- Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC, Moon HW. Plasmid-mediated adhesion in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1983 Jan;2(3):534-8.
- Bardiau M, Szalo M, Mainil JG. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells.

Vet Res. 2010;41(5).

Batchelor M, Knutton S, Caprioli A, Huter V, Zaniat M, Dougan G, Frankel G. Development of a universal Intimin antiserum and PCR primers. J Clin Microbiol. 1999 Dec; 37(12):3822-7.

Batisson I, Guimond M, Girard F, An H, Zhu C, Oswald E, Fairbrother JM, Jacques M, Harel J. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. Infect Immun. 2003;71(8):4516-25.

Beraldo LG, Borges CA, Maluta RP, Cardozo MV, Rigobelo EC, De Ávila FA. Detection of Shiga toxigenic (STEC) and Enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. Vet Microbiol. 2014 May 14;170(1-2):162-6.

Beutin L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. Vet Res. 1999;30:285-98.

Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. J Infect Dis. 2000;181(2):602-12.

Bielaszewska M, Middendorf B, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, Karch H, Schmidt MA, Mellmann A. Shiga Toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in host pathogen evolution. Clin Infect Dis. 2008;47(2):208-17.

Bielaszewska M, Prager R, Köck R, Mellmann A, Zhang W, Tschäpe H, Tarr PI, Karch H. Shiga toxin gene loss and transfer *in vitro* and *in vivo* during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. Appl Environ Microbiol. 2007;73(10):3144-50.

Biesecker S, Nicastro L, Wilson R, Tükel Ç. The functional amyloid curli protects *Escherichia coli* against complement-mediated bactericidal activity. Biomolecules. 2018;8(1):5.

Bird BR, Forrester FT, Control C for D. Basic Laboratory Techniques in cell culture. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Bureau of Laboratories, Laboratory Training and Consultation Division, Virology Training Branch; 1981.

Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J. Serotypes , virulence genes , and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin) -producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo , Spain , from 1992 through 1999. J Clin Microbiol. 2004;42(1):311-9.

Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso J, Alonso MP, Dahbi G, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin) -producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1351-6.

Blank TE, Zhong H, Bell A, Whittam TS, Donnenberg MS. Molecular variation among type IV pilin (*bfpA*) genes from diverse Enteropathogenic *Escherichia coli* strains. Infect Immun. 2000; 68(12):7028-38.

Bray J, Beavan TED. Slide agglutination of *Bacterium coli* var. *neapolitanum* in summer diarrhæa. J Pathol Bacteriol. 1948 Jul 1;60(3):395–401.

Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhœa of infants. J Pathol Bacteriol. 1945 Mar 1;57(2):239–47.

Brunder W, Schmidt H, Frosch M, Karch H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. Microbiology. 1999;145(5):1005–14.

Bugarel M, Martin A, Fach P, Beutin L. Virulence gene profiling of Enterohemorrhagic (EHEC) and Enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. BMC Microbiol. 2011 Jan;11(1):142.

Caravelli A, Luz DE, Andrade FB, Moraes CTP, Maranhão AQ, Piazza RMF. Sensitive and specific detection of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* using recombinant anti-intimin antibody by immunofluorescence assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013 Dec; 77(4): 301-3.

Carvalho AC, Barbosa A V., Arais LR, Ribeiro PF, Carneiro VC, Cerqueira AMF. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. Brazilian J Microbiol. 2016;47(1):150–8.

Cepeda-molero M, Berger CN, Walsham ADS, Ellis SJ, Wemyss-holden S, Schüller S Frankel G, Fernández LÁ. Attaching and effacing (A / E) lesion formation by Enteropathogenic *E . coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors. 2017;1–23.

Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. FEMS Microbiol Rev. 2005;29(1):83-98.

Chung YS, Park YK, Park YH, Park KT. Probable secondary transmission of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* between people living with and without pets. J Vet Med Sci. 2017;79(3):486–91.

Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: A prospective controlled study. J Pediatr. 2005 Nov 12;146(1):54–61.

Contreras TJO & Contreras CA. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. Curr Opin Infect Dis. 2011; 24(5):(10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b):pages 478–483.

Cookson AL, Cooley WA, Woodward MJ. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. Int J Med Microbiol. 2002;292(3–4):195–205.

Coombes BK, Wickham ME, Mascarenhas M, Gruenheid S, Finlay BB, Karmali MA. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. Appl Environ Microbiol. 2008 Apr;74(7):2153–60.

Cordeiro F, da Silva RIK, Vargas-Stampe TLZ, Cerqueira AMF, Andrade JRC. Cell invasion and survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within cultured human intestinal epithelial cells. *Microbiology*. 2013;159(8):1683–94.

Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Oct;26(4):822–80.

Daoud Z, Salem Sokhn E, Masri K, Cheaito K, Haidar-Ahmad N, Matar GM, Doron S. *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of lebanese patients between 2005 and 2012: epidemiology and profiles of resistance. *Front Med*. 2015;2:1–11.

Devriese S, Van den Bossche L, Van Welden S, Holvoet T, Pinheiro I, Hindryckx P, De Vos M, Laukens D. T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. *Histochem Cell Biol*. 2017; 148:85–93.

Eichhorn I, Heidemanns K, Ulrich RG, Schmidt H, Semmler T, Fruth A, Bethe A, Goulding D, Pickard D, Karch H, Wieler LH. Lysogenic conversion of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) from human, murine, and bovine origin with bacteriophage Φ 3538 Δ stx2::cat proves their Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) progeny. *Int J Med Microbiol*. 2018;(June):0–1.

Escherich, T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medizin*. 3:515–522 e 547–554. 1885.

Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JI, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2009;47(1):93–8.

Franzin FM, Sircili MP. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *Biomed Res Int*. 2015;2015.

Gangiredla J, Mammel MK, Barnaba TJ, Tartera C, Gebru ST, Patel IR, Leonard SR, Kotewicz ML, Lampel KA, Elkins CA, Lacher DW. Draft genome sequences of *Escherichia albertii*, *Escherichia fergusonii*, and strains belonging to six cryptic lineages of *Escherichia* spp. *Genome Announc*. 2018;6(18).

Gannon VPJ, Rashed M, King RK, Thomas EJG. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1993 May; 31(5):1268–74.

García-Angulo VA, Martínez-Santos VI, Villaseñor T, Santana FJ, Huerta-Saquero A, Martínez LC, Jiménez R, Lara-Ochoa C, Téllez-Sosa J, Bustamante VH, Puente JL. A distinct regulatory sequence is essential for the expression of a subset of *nle* genes in attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2012 Oct;194(20):5589–603.

Gibreel TM, Dodgson AR, Cheesbrough J, Bolton FJ, Fox AJ, Upton M. High metabolic potential may contribute to the success of ST131 uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin*

Microbiol. 2012; 50(10):3202–7.

Girão DM. Etiologia da diarreia infantil na região metropolitana do Rio de Janeiro: caracterização de possíveis marcadores de virulência em *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e de uma adesina relacionada ao fenótipo agregativo em amostras que co-expressam AD. Tese de doutorado. Curso de pós-graduação em microbiologia. 2007. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo.

Girón JA, Qadri F, Azim T, Jarvis KJ, Kaper JB, Albert MJ. Monoclonal antibodies specific for the bundle-forming pilus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1995; 63(12):4949-52.

Gismero-Ordoñez J, Dall'Agnol M, Trabulsi LR, Girón JA. Expression of the bundle-forming pilus by Enteropathogenic *Escherichia coli* strains of heterologous serotypes. J Clin Microbiol. 2002; 40(6):2291-6.

Glotfelty LG, Zahs A, Hodges K, Shan K, Alto NM, Hecht GA. Enteropathogenic *E. coli* effectors EspG1/G2 disrupt microtubules, contribute to tight junction perturbation and inhibit restoration. Cell Microbiol. 2014;16(12):1767–83.

Gomes T a T, Hernandez RT, Torres AG, Salvador F a, Guth BEC, Vaz TMI, Irino K, Silva RM, Vieira MA. Adhesin-encoding genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical Enteropathogenic *E. coli*. J Clin Microbiol. 2011 Sep;49(9):3334–7.

Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Falcão J, Piazza RMF, Ferreira LC, Martinez MB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian J Microbiol. 2016;1–28.

Gomes TAT, Irino K, Girão DM, Girão VBC, Guth BEC, Vaz TMI, Moreira FC, Chinarelli SH, Vieira MAM. Emerging Enteropathogenic *Escherichia coli* strains? Emerg Infect Dis. 2004;10(10):1851–5.

Gonzales AGM, Cerqueira AMF, Guth BEC, Coutinho CA, Liberal MHT, Souza RM, Andrade JRC. Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. J Appl Microbiol. 2016;121:1130-43.

Gophna U, Barlev M, Seijffers R, Oelschlager T a, Ron EZ. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. Infect Immun. 2001;69(4):2659–65.

Grützkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. Gut. 1990;31(9):1011–5.

Guinee PAM, Jansen WH, Agterberg CM. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. Infect Immun. 1976;13(5):1369–77.

Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol*. 1995 May; 33(5):1375-7.

Harada K, Okada E, Shimizu T, Kataoka Y, Sawada T, Takahashi T. Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* isolates: a comparative analysis between dogs and their owners in Japan. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2012;35(2):139–44.

Hata H, Natori T, Mizuno T, Kanazawa I, Eldesouky I, Hayashi M, Miyata M, Fukunaga H, Ohji S, Hosoyama A, Aono E, Yamazoe A, Tsuchikane K, Fujita N, Ezaki T. Phylogenetics of family Enterobacteriaceae and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. *Microbiol Immunol*. 2016;60(5):303–11.

Hedberg CW, Savarino SJ, Besser JM, Paulus CJ, Thelen VM, Myers LJ, Cameron DN, Barrett TJ, Kaper JB, Osterholm MT. 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*. 1997;176(6):1625–8.

Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*. 2015;16(1):270.

Hernandes RT, Elias WP, Vieira M a M, Gomes T a T. An overview of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Aug;297(2):137–49.

Hernandes RT, Velsko I, Sampaio SCF, Elias WP, Robins-Browne RM, Gomes T a T, Girón JA.. Fimbrial adhesins produced by atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Dec;77(23):8391–9.

Hodges K, Gill R. Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanisms. 2010;1(1):4–21.

Hu J, Torres AG. Enteropathogenic *Escherichia coli*: Foe or innocent bystander? *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(8):729–34.

Imhoff JF. Enterobacteriales. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2, The Proteobacteria, Parte B The Gammaproteobacteria*. Em: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, Boone DR, De Vos P, et al., editors. Boston, MA: Springer US; 2005. p. 587–850.

Ingle DJ, Tauschek M, Edwards DJ, Hocking DM, Pickard DJ, Azzopardi KI, Amarasena T, Bennett-Wood V, Pearson JS, Tamboura B, Antonio M, Ochieng JB, Oundo J, Mandomando I, Qureshi S, Ramamurthy T, Hossain A, Kotloff KL, Nataro JP, Dougan G, Levine MM, Robins-Browne RM, Holt KE. Evolution of atypical Enteropathogenic *E. coli* by repeated acquisition of LEE pathogenicity island variants. *Nat Microbiol*. 2016 Jan 18;1:15010.

Jacob E, Lorber B. Diseases transmitted by man's best friend: the dog. *Microbiol Spectrum*. 2015; 3(4): 1-15.

Jay-Russell MT, Hake AF, Bengson Y, Thiptara A, Nguyen T. Prevalence and

characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from stray dog and coyote feces in a major leafy greens production region at the United States-Mexico border. PLoS One. 2014;9(11).

Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC, Stell AL. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. Infect Immun. 2000;68(5):3040–7.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2(2):123–40.

Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. PLoS One. 2013;8(9).

Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, Rocha-Ramírez LM, Mas-Oliva J, Eslava CA, Girón JA, Xicohtencatl-Cortés J. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. PLoS One. 2010;5(8).

Lim JY, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. J Microbiol Biotechnol. 2010;20(1):5–14.

Liu S, Jin D, Lan R, Wang Y, Meng Q, Dai H, Lu S, Hu S, Xu J. *Escherichia marmotae* sp. nov., isolated from faeces of *Marmota himalayana*. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(7):2130–4.

Liu X, Liu H, Li Y, Hao C. High prevalence of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from dogs in Shaanxi, China. Front Microbiol. 2016;7:1–9.

Lu Y, Toma C, Honma Y, Iwanaga M. Detection of EspB using reversed passive latex agglutination: application to determination of Enteropathogenic *Escherichia coli*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 May; 43(1): 7-12.

MacCannell D. Bacterial strain typing. Clin Lab Med. 2013;33(3):630–50.

Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. Vet Immunol Immunopathol. 2013 Mar 15;152(1–2):2–12.

Maluta RP, Logue CM, Casas MRT, Meng T, Guastalli EAL, Rojas TCG, Montelli AC, Sadatsune T, de Carvalho Ramos M, Nolan LK, da Silveira WD. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human Extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. PLoS One. 2014; 9(8).

Manges AR, Harel J, Masson L, Edens TJ, Portt A, Reid-Smith RJ, Zhanel GG, Kropinski AM, Boerlin P. Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with *Escherichia coli* from human and animal sources. Foodborne Pathog Dis. 2015;12(4):302–10.

- Marshall J, Rossez Y, Mainda G, Gally DL, Daniell TJ, Holden NJ. Alternate thermoregulation and functional binding of *Escherichia coli* type 1 fimbriae in environmental and animal isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;363(22):1–8.
- Martins FH, Guth BEC, Piazza RMF, Elias WP, Leão SC, Marzoa J, Dahbi G, Mora A, Blanco M, Blanco J, Pelayo JS. Lambs are an important source of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. *Vet Microbiol*. 2016 Nov 30;196:72–7.
- McCormick BA, Parkos CA, Colgan SP, Carnes DK, Madara JL. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella* Typhimurium. *J Immunol*. 1998;160(1):455 LP-466.
- McNamara BP, Koutsouris A, O’Connell CB, Nougayréde JP, Donnenberg MS, Hecht G. Translocated EspF protein from Enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest*. 2001;107(5):621–9.
- McWilliams BD, Torres AG. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesins. *Microbiol Spectr*. 2014;
- Menezes MA, Aires KA, Ozaki CY, Ruiz RM, Pereira MCA, Abreu PAE, Elias WP, Ramos OHP, Piazza RMF. Cloning approach and functional analysis of anti-intimin single-chain variable fragment (scFv). *BMC Res Notes*. 2011. 4(30): 2-9.
- Mercado EH, Piscoche C, Contreras C, Durand D, Riveros M, Ruiz J, Ochoa TJ. Pathogenicity Island O-122 in Enteropathogenic *Escherichia coli* strains is associated with diarrhea severity in children from Lima, Peru. *Int J Med Microbiol*. 2016 Jun 10;306(4):231–6.
- Mohsin J, Pál T, Petersen JE, Darwish D, Ghazawi A, Ashraf T, Sonnevend A. Plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in an *Escherichia coli* ST10 bloodstream isolate in the Sultanate of Oman. *Microb Drug Resist*. 2017; 11.
- Monaghan Á, Byrne B, Fanning S, Sweeney T, McDowell D, Bolton DJ. Serotypes and virulence profiles of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. *J Appl Microbiol*. 2013 Feb;114(2):595–603.
- Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA. Attaching and effacing activities of rabbit and human Enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun*. 1983;41(3):1340–51.
- Morabito S, Tozzoli R, Oswald E, Caprioli A. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect Immun*. 2003;71(6):3343–8.
- Moraes CTP, Polatto JM, Rossato SS, Izquierdo M, Munhoz DD, Martins FH, Pimenta DC, Farfan MJ, Elias WP, Barbosa ÂS, Piazza RM. Flagellin and GroEL mediates in vitro binding of an atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* to cellular fibronectin. *BMC Microbiol*. 2015;1–10.
- Moreira FC, Vieira M a M, Ferreira AJP, Girão DM, Vaz TMI, Rosa ACP, Knobl T, Irino K,

Freymüller E, Gomes TA. *Escherichia coli* strains of serotype O51:H40 comprise typical and atypical Enteropathogenic *E. coli* strains and are potentially diarrheagenic. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr;46(4):1462–5.

Moreno ACR, Filho AF, Gomes T do AT, Ramos STS, Montemor LPG, Tavares VC, Filho Ldos S, Irino K, Martinez MB. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;12;66(1):50–7.

Moura RA, Sircili MP, Leomil L, Matté MH, Trabulsi LR, Elias WP, Irino K, Pestana de Castro AF. Clonal relationship among atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(23):7399–408.

Munhoz DD, Nara JM, Freitas NC, Moraes CTP, Nunes KO, Yamamoto BB, Vasconcellos FM, Martínez-Laguna Y, Girón JA, Martins FH, Abe CM, Elias WP, Piazza RMF. Distribution of major pilin subunit genes among atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and influence of growth media on expression of the ECP operon. *Front Microbiol.* 2018;9:1–10.

Nakasone N, Toma C, Lu Y, Iwanaga M. Development of a rapid immunochromatographic test to identify Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* by detecting EspB. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Jan;57(1):21-5.

Nakazato G, Gyles C, Ziebell K, Keller R, Trabulsi LR, Gomes TAT, Irino K, Da Silveira WD, Pestana De Castro AF. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human Enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Vet Microbiol.* 2004 Aug 6;101(4):269–77.

Nara JM, Cianciarullo AM, Culler HF, Bueris V, Horton DSPQ, Menezes MA, Franzolin MR, Elias WP, Piazza RMF. Differentiation of typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. *J Appl Microbiol.* 2010; 109:35-43.

Nascimento HH, Silva LEP, Souza RT, Silva NP, Scaletsky IC. Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. *BMC Microbiol.* 2014;14(1):184.

Navarro-Garcia F. *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an Enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. *Microbiol Spectr.* 2014;2(6):1–19.

Naziri Z, Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Shojaee Tabrizi A. DNA fingerprinting approaches to trace *Escherichia coli* sharing between dogs and owners. *J Appl Microbiol.* 2016 Feb 1;120(2):460–8.

Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gino RM, Gorzynski EA. Demonstration of antibodies against Enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics.* 1955 Dec 1;16(6):801–8.

Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Robins-Browne RM. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg Infect Dis.* 2006 Apr; 12(4):597-603.

Nougayrède J-P, Fernandes PJ, Sonnenberg MS. Adhesion of Enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol.* 2003;5(6):359–72.

Nüesch-Inderbinen MT, Baschera M, Zurfluh K, Hächler H, Nüesch H, Stephan R. Clonal diversity, virulence potential and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* causing community acquired urinary tract infection in Switzerland. *Front Microbiol.* 2017; 8.

Nunes M do RCM, Magalhães PP, Macêdo A da S, Franco RT, Penna FJ, Mendes EN. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Jan 1;106(1):43–7.

Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun.* 2000;68(1):64–71.

Pacheco VCR, Yamamoto D, Abe CM, Hernandez RT, Mora A, Blanco J, Gomes TA. Invasion of differentiated intestinal Caco-2 cells is a sporadic property among atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying common intimin subtypes. *Pathog Dis.* 2014;70(2):167–75.

Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, Barnich N, Ng SC, Colombel JF. *Adherent-invasive Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2017 Nov 15;

Paton A, Paton J. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb O111* and *rfbO157*. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):598–602.

Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* 2001;69(11):6999–7009.

Pearson JS, Giogha C, Wong Fok Lung T, Hartland EL. The genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu Rev Genet.* 2016;50(1):493–513.

Pedersen GA, Jensen HH, Schelde ASB, Toft C, Pedersen HN, Ulrichsen M, Login FH, Amieva MR, Nejsum LN. The basolateral vesicle sorting machinery and basolateral proteins are recruited to the site of Enteropathogenic *E. coli* microcolony growth at the apical membrane. *PLoS One.* 2017;12(6):1–21.

Pelayo JSS, Scaletsky ICACA, Pedroso MZZ, Sperandio V, Girón JAA, Frankel G, Trabulsi LR. Virulence properties of atypical EPEC strains. *J Med Microbiol.* 1999;48(1):41–9.

Peralta-Ramírez J, Hernandez M, Manning-Cela R, Luna-Muñoz J, Garcia-Tovar C, Nougayrède JP, Oswald E, Navarro-Garcia F. EspF interacts with nucleation-promoting

factors to recruit junctional proteins into pedestals for pedestal maturation and disruption of paracellular permeability. *Infect Immun*. 2008;76(9):3854–68.

Pereira ACM, Britto-Filho JD, Carvalho JJ, Luna MG, Rosa ACP. Enteraggative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. *Microb Pathog*. 2008; 45(5-6):310-4.

Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2013;16:38–53.

Pitondo-Silva A, Nakazato G, Falcão JP, Irino K, Martinez R, Darini ALC, Hernandez RT. Phenotypic and genetic features of Enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal children in the Ribeirão Preto metropolitan area, São Paulo State, Brazil. *APMIS*. 2014 Sep 25;126(6):1–8.

Pitout JDD, DeVinney R. *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Research*. 2017; 28(6).

Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006;124(4):715–27.

Puño-Sarmiento J, Medeiros L, Chiconi C, Martins F, Pelayo J, Rocha S, Blanco J, Blanco M, Zanutto M, Kobayashi R, Nakazato G. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Vet Microbiol*. 2013;166(3–4):676–80.

Rendón M a, Saldaña Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vázquez A, Kaper JB, Puente JL, Girón JA. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(25):10637–42.

Rocha LB, Santos ARR, Munhoz DD, Cardoso LTA, Luz DE, Andrade FB, Horton DSPQ, Elias WP, Piazza RMF. Development of a rapid agglutination latex test for diagnosis of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in developing world: defining the biomarker, antibody and method. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Sep; 8(9):e3150.

Rosa ACP, Vieira MAM, Tibana A, Gomes TAT, Andrade JRC. Interactions of *Escherichia coli* strains of non-EPEC serogroups that carry *eae* and lack the EAF and *stx* gene sequences with undifferentiated and differentiated intestinal human Caco-2 cells. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;200(1):117–22.

Saldaña Z, Erdem AL, Schüller S, Okeke IN, Lucas M, Sivananthan A, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Girón JA. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J Bacteriol*. 2009;191(11):3451–61.

Salvador FA, Hernandez RT, Vieira MAM, Rockstroh AC, Gomes TAT. Distribution of non-LEE-encoded type 3 secretion system dependent effectors in Enteropathogenic *Escherichia coli*. 2014;855:851–5.

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005; 21:1-26.

Sampaio SCF, Andrade JRC, Sampaio JLM, Carneiro CRW, Freymüller E, Gomes TAT. Distinct interaction of two atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains with enterocytes *in vitro*. 2011;40:65–71.

Sampaio SCF, Gomes T a T, Pichon C, du Merle L, Guadagnini S, Abe CM, Sampaio JL, Le Bouguénec C. The flagella of an atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strain are required for efficient interaction with and stimulation of interleukin-8 production by enterocytes *in vitro*. *Infect Immun.* 2009 Oct;77(10):4406–13.

Sampaio SCF, Luiz WB, Vieira MAM, Ferreira RCC, Garcia BG, Sinigaglia-Coimbra R, Sampaio JLM, Ferreira LCS, Gomes TAT. Flagellar cap protein FliD mediates adherence of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* to enterocyte microvilli. *Infect Immun.* 2016;84(4):1112–22.

Sampaio SCF, Moreira FC, Liberatore AMA, Vieira MAM, Knobl T, Romão FT, Hernandez RT, Ferreira CS, Ferreira AP, Felipe-Silva A, Sinigaglia-Coimbra R, Koh IH, Gomes TA. Analysis of the virulence of an atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strain *in vitro* and *in vivo* and the influence of type three secretion system. *Biomed Res Int.* 2014 Jan;2014:797508.

Santona S, Diaz N, Fiori PL, Francisco M, Sidat M, Cappuccinelli P, Rappelli P. Genotypic and phenotypic features of Enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7(3):214–9.

Scaletsky ICA, Aranda KRS, Souza TB, Silva NP. Adherence factors in atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. *J Clin Microbiol.* 2010;48(1):302–6.

Scheutz F, Strockbine NA. *Escherichia*. Em: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd; 2015.

Sekse C, Sunde M, Lindstedt BA, Hopp P, Bruheim T, Cudjoe KS, Kvitle B, Urdahl AM. Potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O26 in Norwegian sheep flocks. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(14):4949–58.

Shabana II, Zaraket H, Suzuki H. Molecular studies on diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from humans and animals in Egypt. *Vet Microbiol.* 2013;167(3):532–9.

Silveyra IM, Pereyra AM, Alvarez MG, Villagran MD, Baroni AB, Deza N, Carbonari CC, Miliwebsky E, Rivas M. Isolation of Enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H16 identified in a diarrhea case in a child and his household contacts in La Pampa Province, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2015 Oct 1;47(4):317–21.

Smith DR, Price JE, Burby PE, Blanco LP, Chamberlain J, Chapman MR. The production of curli amyloid fibers is deeply integrated into the biology of *Escherichia coli*. *Biomolecules.* 2017; 7(75):1–26.

- Spano LC, da Cunha KF, Monfardini MV, de Cássia Bergamaschi FR, Scaletsky ICA. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):1–9.
- Srimanote P, Paton AW, Paton JC. Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun*. 2002;70(6):3094–100.
- Stærk K, Khandige S, Kolmos HJ, Møller-Jensen J, Andersen TE. Uropathogenic *Escherichia coli* express type 1 fimbriae only in surface adherent populations under physiological growth conditions. *J Infect Dis*. 2016;213(3):386–94.
- Tapia R, Kralicek SE, Hecht GA. EPEC effector EspF promotes Crumbs3 endocytosis and disrupts epithelial cell polarity. *Cell Microbiol*. 2017;19(11):12757.
- Tatarczak M, Wieczorek K, Posse B, Osek J. Identification of putative adhesin genes in Shiga toxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. *Vet Microbiol*. 2005;110(1–2):77–85.
- Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(5):508–13.
- Tseng M, Fratamico PM, Bagi L, Delannoy S, Fach P, Manning SD, Funk JA. Diverse virulence gene content of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from finishing swine. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(20):6395–402.
- Turk J, Maddox C, Fales W, Ostlund E, Miller M, Johnson G, Pace L, Turnquist S, Kreeger J. Examination for heat-labile, heat stable, and Shiga-like toxins and for the *eaeA* gene in *Escherichia coli* isolates obtained from dogs dying with diarrhea: 122 cases (1992–1996). *J Am Vet Med Assoc*. 1998; 212:1735–6.
- Varela G, Batthyány L, Bianco MN, Pérez W, Pardo L, Algorta G, Robino L, Suárez R, Navarro A, Pérez MC, Schelotto F. Enteropathogens associated with acute diarrhea in children from households with high socioeconomic level in Uruguay. *Int J Microbiol*. 2015;2015.
- Vasco K, Graham JP, Trueba G. Detection of zoonotic enteropathogens in children and domestic animals in a semirural community in Ecuador. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(14):4218–24.
- Vieira M a, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa a C, Dias a M, Ramos SR, Frankel G, Gomes TA. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. *J Infect Dis*. 2001;183(5):762–72.
- Vieira MA, Dos Santos LF, Dias RCB, Camargo CH, Pinheiro SRS, Gomes TAT, Hernandez RT. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak associated diarrhoea in Brazil. *J Med Microbiol*. 2016;65(9):998–1006.
- Vieira MAM, Salvador FA, Silva RM, Irino K, Vaz TMI, Rockstroh AC, Guth BE, Gomes TA. Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical

Enteropathogenic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1452–5.

Walk ST. The "cryptic" *Escherichia*. EcoSal Plus. 2015;6(2).

Wang X, Rochon M, Lamprokostopoulou A, Lünsdorf H, Nimtz M, Römling U. Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. Cell Mol Life Sci. 2006;63(19–20):2352–63.

Weflen AW, Alto NM, Viswanathan VK, Hecht G. *E. coli* secreted protein F promotes EPEC invasion of intestinal epithelial cells via an SNX9-dependent mechanism. Cell Microbiol. 2010;12(7):919–29.

Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol. 2006;60(5):1136–51.

Wong ARC, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, Frankel G, Hartland EL. Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. Mol Microbiol. 2011 Jun;80(6):1420–38.

World Health Organization. The treatment of diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers. 4th rev. Geneva. 2005. <http://www.who.int/iris/handle/10665/43209>

Xicohtencatl-cortes J, Monteiro-neto V, Ledesma MA, Jordan DM, Francetic O, Kaper JB, Puente JL, Girón JA. Intestinal adherence associated with type IV pili of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. 2007;117(11):21–4.

Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Saldaña Z, Ledesma MA, Puente JL, Girón JA. The type 4 pili of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. J Bacteriol. 2009;91(1):411–21.

Xu Y, Bai X, Jin Y, Hu B, Wang H, Sun H, Fan R, Fu S, Xiong Y. High prevalence of virulence genes in specific genotypes of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:1–12.

Yamamoto D, Hernandez RT, Blanco M, Greune L, Schmidt MA, Carneiro SM, Dahbi G, Blanco JE, Mora A, Blanco J, Gomes TA. Invasiveness as a putative additional virulence mechanism of some atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains with different uncommon intimin types. BMC Microbiol. 2009 Jan;9:146.

Yu F, Chen X, Zheng S, Han D, Wang Y, Wang R, Wang B, Chen Y. Prevalence and genetic diversity of human diarrheagenic *Escherichia coli* isolates by multilocus sequence typing. Int J Infect Dis. 2018;67:7–13.

Zheng B, Lv T, Xu H, Yu X, Chen Y, Li J, Huang C, Guo L, Zhang J, Jiang X, Xiao Y, Li L. Discovery and characterization of an *Escherichia coli* ST206 strain producing NDM-5 and MCR-1 from a patient with acute diarrhea. Int J Antimicrob Agents. 2017.

Zhou H-W, Zhang T, Ma J-H, Fang Y, Wang H-Y, Huang Z-X, Wang Y, Wu C, Chen GX. Occurrence of plasmid- and chromosome-carried *mcr-1* in waterborne Enterobacteriaceae in

China. *Antimicrob Agents Chemother* . 2017; 61(8).