

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 19/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DE ESTRUTURAS BACTERIANAS ENVOLVIDAS  
NO ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE ADERÊNCIA HÍBRIDO  
LOCALIZADO/DIFUSO EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA PERTENCENTES AO SOROTIPO  
O2:H16

**CANDIDATA: MELISSA ARRUDA VIEIRA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES**

**CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. TÂNIA APARECIDA TARDELLI GOMES DO  
AMARAL**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Microrganismos*

*Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez*

**BOTUCATU – SP  
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vieira, Melissa Arruda.

Avaliação de estruturas bacterianas envolvidas no estabelecimento do padrão de aderência híbrido localizado/difuso em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica pertencentes ao sorotipo O2:H16 /  
Melissa Arruda Vieira. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez  
Coorientador: Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral  
Capes: 21201021

1. *Escherichia coli* enteropatogênica. 2. Patogenicidade.  
3. Diarreia. 4. Adesinas de *Escherichia coli*.

Palavras-chave: Adesinas; Diarreia; *Escherichia coli* enteropatogênica atípica; Intimina; Patogenicidade bacteriana.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais, Neusa e José, grandes exemplos força e  
superação, por todo amor e carinho, paciência e apoio  
incondicionais.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e ânimo para superação dos desafios diários.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez, por ter aberto as portas de seu laboratório, no qual tive a oportunidade de construir toda minha carreira acadêmica até o momento.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral, por todo conhecimento transmitido, sempre com tanta gentileza e respeito.

À Dra. Mônica Aparecida Midolli Vieira pela orientação para realização dos ensaios de conjugação bacteriana.

À Dra. Fernanda Fernandes dos Santos pelo auxílio na realização das análises de polimorfismos.

Ao Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior e toda sua equipe, por terem aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar os experimentos de clonagem e sequenciamento.

Ao doutorando Paulo Alfonso Schuroff, por todo apoio na realização dos experimentos de clonagem e sequenciamento.

Ao pesquisador científico Dr. Luis Fernando dos Santos, pela cessão das amostras estudadas.

Aos meus companheiros de laboratório e departamento Regiane Dias, Rodrigo Tanabe, Stéfani Dantas, Henrique Orsi, Aline Missio e Juliana Toledo não somente pela troca de conhecimento científico, mas por todos bons momentos compartilhados.

À toda equipe do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela convivência de todos esses anos e aprendizado que vai além da vida acadêmica.

Aos meus pais, que sempre estiveram presentes, me apoiando e incentivando nos bons e maus momentos.

Ao meu namorado Murilo Stanzione, por todo amor, carinho, cuidado e paciência.

Ao meu grande amigo Rodolfo Samadello, por todos os anos de amizade e apoio.

À Capes pela concessão da minha bolsa de estudo.

Muito obrigada por fazerem parte desse momento tão importante da minha vida!

*“Temos de nos tornar a mudança que queremos ver.”*  
(Mahatma Gandhi)

## SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVO GERAL .....	21
2.1. Objetivos específicos .....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1. Amostras bacterianas .....	22
3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	23
3.3. Cultivo celular.....	23
3.4. Teste de adesão com células epiteliais (HeLa). .....	24
3.5. Teste quantitativo de adesão .....	25
3.6. Teste de invasão em células Caco-2 .....	25
3.7. Teste de identificação da polimerização da actina.....	26
3.8. Detecção de genes responsáveis por codificar adesinas .....	26
3.9. Perfil plasmidial .....	27
3.10. Conjugação bacteriana .....	27
3.11. Teste de aglutinação com <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	28
3.12. Preparo de células eletrocompetentes e eletroporação.....	29
3.13. Obtenção de uma biblioteca de mutantes deficientes na adesão às células epiteliais (HeLa) e identificação de potenciais adesinas associadas a esse fenótipo .....	30
3.14. Construção e complementação de mutantes não polares nos genes <i>escN</i> e <i>eae</i> .....	32
3.15. Determinação da curva de crescimento bacteriano.....	34
3.16. Análise de polimorfismos nas sequências de EspA, EspB e EspD.....	34
3.17. Análise estatística.....	34

4. RESULTADOS .....	35
4.1. Amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16 exibiram distintos padrões de aderência.....	35
4.2. Amostras de aEPEC aderem eficientemente a diferentes linhagens celulares, independentemente do padrão de aderência .....	36
4.3. Parte das amostras de aEPEC demonstraram potencial de invadir células intestinais polarizadas e diferenciadas <i>in vitro</i> .....	37
4.4. Todas as amostras testadas apresentam potencial de induzir acúmulo de filamentos de actina no sítio de aderência bacteriano .....	38
4.5. Amostras de aEPEC estudadas albergam genes responsáveis por codificar estruturas adesivas .....	40
4.6. Amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16 produzem fímbria do tipo I.....	42
4.7. Fímbria do tipo I altera padrão híbrido AL/AD da amostra 282/14 do sorotipo O2:H16 .....	43
4.8. A análise do perfil plasmidial revelou a presença de pelo menos dois plasmídeos de alto peso molecular nas amostras estudadas.....	44
4.9. Identificação de mutantes aleatórios deficientes na interação com células HeLa.....	45
4.10. Avaliação comparativa dos mutantes nos genes <i>eae</i> e <i>escN</i> , e seus respectivos complementados, com a amostra selvagem 282/14 .....	48
4.11. A interação Intimina-Tir é importante para o estabelecimento do fenótipo AL/AD na amostra de aEPEC 282/14, pertencente ao sorotipo O2:H16.....	51
4.12. As mutações nos genes <i>eae</i> e <i>escN</i> interferem na capacidade das amostras em recrutar filamentos de actina no sítio de aderência bacteriano .....	54
4.13. Alinhamento múltiplo indica variabilidade entre as sequências de EspA, EspB e EspD das amostras estudadas e da amostra protótipo de tEPEC .....	56
4.14. Amostras de aEPEC estudadas apresentam polimorfismos específicos em um domínio funcional de EspD.....	59



5.	DISCUSSÃO .....	61
6.	CONCLUSÕES .....	67
7.	REFERÊNCIAS .....	68

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura e transmissão mostrando o pedestal característico da lesão AE após interação com células epiteliais cultivadas <i>in vitro</i> .....	16
Figura 2. Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo 3 de patógenos capazes de induzir a lesão AE.....	17
Figura 3. Representação esquemática das etapas de obtenção de mutantes deficientes na adesão às células epiteliais e identificação de potenciais novos genes que codificam estruturas bacterianas associadas ao fenótipo de adesão em uma amostra de aEPEC.....	31
Figura 4. Microscopia óptica exibindo os padrões de aderência das amostras pertencentes ao sorotipo O2:H16, em células HeLa cultivadas <i>in vitro</i> .....	36
Figura 5. Dados quantitativos de aderência em células HeLa, demonstrando semelhança no potencial de interação com células HeLa nas amostras estudadas.....	37
Figura 6. Dados quantitativos dos testes de invasão realizados em células Caco-2 polarizadas e diferenciadas.....	38
Figura 7. Microscopia de fluorescência exibindo os resultados obtidos no teste de FAS .....	39
Figura 8. Teste de aglutinação com <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	42
Figura 9. Padrões de aderência produzidos pela amostra 282/14 na presença e ausência de D-manopiranosídeo.....	43
Figura 10. Gel de agarose resultante do experimento de perfil plasmidial, evidenciando a presença de pelo menos duas bandas plasmidiais de alto peso molecular em cada amostra.....	44

Figura 11. Padrões de aderência da amostra selvagem 282/14 e seus respectivos mutantes M1, M232, M236, M246, M259, M265, M276, M277 e M289. ....	46
Figura 12. Curva de crescimento dos mutantes Tn5 gerados a partir de mutagênese aleatória e da amostra selvagem, 282/14.....	47
Figura 13. Géis de agarose exibindo a ausência do gene <i>eae</i> nos mutantes construídos e posterior amplificação para as amostras complementadas .....	49
Figura 14. Géis de agarose demonstrando a ausência das bandas referentes à amplificação do gene <i>escN</i> e sua presença nas amostras complementadas.....	50
Figura 15. Curva de crescimento dos mutantes gerados a partir do sistema Lambda Red com a amostra 282/14.....	51
Figura 16. Padrão de aderência da amostra selvagem de aEPEC 282/14, do mutante isogênico no gene <i>eae</i> e da amostra complementada, bem como dados de experimentos quantitativos da interação dessas três amostras com células HeLa .....	52
Figura 17. Padrões de aderência da amostra selvagem de aEPEC 282/14, do mutante isogênico no gene <i>escN</i> e da amostra complementada com pEscN, bem como dados de experimentos quantitativos dessas três amostras .....	53
Figura 18. Microscopia de fluorescência para detecção do acúmulo de F-actina, no local de aderência bacteriana.....	55
Figura 19. Alinhamento múltiplo entre as sequências de EspA das amostras de aEPEC e da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 .....	56
Figura 20. Alinhamento múltiplo entre as sequências de EspB das amostras de aEPEC e amostra protótipo de tEPEC E2348/69.....	57

Figura 21. Alinhamento múltiplo entre as sequências de EspD das amostras de aEPEC e da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 .....	58
Figura 22. Alinhamento múltiplo entre as sequências do domínio <i>coiled coil</i> (2) de EspD das amostras de aEPEC e da amostra protótipo de tEPEC E2348/69 .....	59

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. aEPEC pertencentes ao sorotipo O2:H16, isoladas de surtos e casos esporádicos de diarreia no Brasil.....	23
Tabela 2. Plasmídeos e amostras utilizados nos experimentos de mutagênese e complementação.....	33
Tabela 3. Sequência dos iniciadores empregados para a mutagênese e confirmação dos eventos de deleção e complementação dos genes <i>eae</i> e <i>escN</i> .....	33
Tabela 4. Padrões de aderência e potencial de induzir acúmulo de actina as amostras pertencentes aos sorotipos O2:H16 .....	40
Tabela 5. Genes responsáveis por codificar estruturas bacterianas adesivas nas amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16 .....	41
Tabela 6. Sítios de inserção do transposon no genoma bacteriano da amostra 282/14.....	48

## Resumo

O principal mecanismo de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é a capacidade de causar uma lesão histopatológica na mucosa intestinal denominada *attaching and effacing* (AE), caracterizada pela aderência íntima das bactérias, destruição das microvilosidades e formação de estruturas semelhantes a pedestais, ricos em F-actina, nos enterócitos infectados. Genes do *locus of enterocyte effacement* (região LEE) codificam todas as proteínas necessárias para a formação da lesão AE. As EPEC são divididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC), com base na presença do EPEC *adherence factor plasmid* no primeiro grupo. A partir de um conjunto de sete amostras de aEPEC pertencentes ao sorotipo O2:H16, obtidos de surtos e casos esporádicos de diarreia, mostramos que cinco deles produziram uma adesão híbrida localizada/difusa (AL/AD) em células HeLa. Neste estudo, uma amostra de aEPEC deste sorotipo (282/14), que produziu o padrão AL/AD, foi selecionada para investigar as estruturas bacterianas envolvidas em seu fenótipo adesivo. Para este propósito, a amostra de aEPEC 282/14 foi mutagenizada usando o kit EZ::TN <R6K<sub>ylori</sub>/KAN-2> Tnp transposome kit, gerando uma biblioteca de inserções Tn5. Esses mutantes de inserção Tn5 foram testados quanto a perda ou redução da capacidade aderente, em ensaios realizados em 6 h de incubação com células HeLa. Dentre 320 clones pesquisados, nove foram considerados deficientes em sua capacidade de interagir com células epiteliais e quatro deles apresentaram a inserção Tn5 em genes da região LEE, como: *tir*, *escV* e *grlR*. Com o intuito de confirmar o papel da interação Intimina-Tir no estabelecimento deste fenótipo híbrido, foram construídos mutantes isogênicos nos genes *eae* e *escN*, que codificam a adesina intimina e a ATPase necessária para a montagem do SST3 (sistema de secreção tipo III), respectivamente. Os mutantes isogênicos gerados na intimina (*eae*) e no translocon do T3SS (*escN*) mostraram uma diminuição no número de bactérias associadas a células ( $P < 0,05$ ), em comparação com a amostra selvagem. A complementação *in trans* restaurou a capacidade dos mutantes *eae* e *escN* em aderirem eficientemente às células HeLa. A busca de polimorfismos em domínios funcionais do SST3 mostrou não interferir na adesão da amostra escolhida para este estudo. Em conclusão, demonstrou-se que o estabelecimento do fenótipo híbrido de adesão AL/AD na amostra de aEPEC 282/14 é dependente exclusivamente da interação Intimina-Tir.

**Palavras-chave:** aEPEC, adesão e sistema de secreção do tipo III (SST3).

## Abstract

The main virulence mechanism of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is the capacity to cause a histopathological lesion on the intestinal mucosa, termed Attaching and Effacing (AE); characterized by intimate bacterial adherence, microvillus destruction and formation of F-actin rich pedestal-like structures, in infected enterocytes. Genes of the locus of enterocyte effacement (LEE region) encode all proteins necessary for AE lesion formation. EPEC are divided in typical (tEPEC) and atypical (aEPEC), based on the presence of the EPEC adherence factor plasmid in the former group. From a collection of seven aEPEC O2:H16, obtained from outbreak and sporadic cases of diarrhea, we showed that five of them produced a hybrid localized/diffuse adherence (LA/DA) in HeLa cells. In this study, we selected one aEPEC isolate of this serotype (282/14) that produced the LA/DA pattern, to investigate the bacterial structures involved in its adhesive phenotype. For this purpose, aEPEC 282/14 was mutagenized using the EZ::TN < R6K<sub>Yori</sub>/KAN-2 > Tnp transposome kit, generating a library of Tn5 insertions. These Tn5 insertion mutants were screened for non-adherent or less adherent mutants, in assays performed in 6 h of incubation with HeLa cells. Among the 320 clones screened, nine were considered deficient in their ability to interact with epithelial cells, and four of them presented the Tn5 insertion in genes within the LEE region, such as *tir*, *escV*, and *grlR*. In order to confirm the role of Intimin-Tir interaction in the establishment of this hybrid phenotype, we constructed isogenic mutants in the *eae* and *escN* genes, which encode the adhesin Intimin and the ATPase necessary for the T3SS (type III secretion system) assembly, respectively. The isogenic mutants generated in the Intimin (*eae*) and T3SS translocon (*escN*) showed a decrease in the number of cell-associated bacteria ( $P < 0.05$ ), as compared to the wild-type strain. In trans complementation restored the ability of the *eae* and *escN* mutants to adhere efficiently to HeLa cells. The screening for polymorphisms in functional domains of the SST3 demonstrated not to interfere with the adherence of the isolate chosen for this study. In conclusion, it was demonstrated that the establishment of the hybrid LA/DA adhesion phenotype in the aEPEC 282/14 isolate is dependent exclusively on the Intimin-Tir interaction.

**Keywords:** aEPEC, adhesion and type III secretion system (T3SS).

## 1. INTRODUÇÃO

A diarreia infecciosa é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de dois milhões de mortes a cada ano, particularmente, entre crianças abaixo de cinco anos de idade (World Health Organization, 2017). Países subdesenvolvidos como os localizados na África e Ásia são os mais afetados, com essas taxas de mortalidade podendo chegar até a 15% (United Nations Children's Fund, 2016), sendo esse cenário diretamente associado à falta de políticas de saneamento básico apropriadas (World Health Organization, 2017).

A doença diarreica pode ser associada a diferentes patógenos, como bactérias, vírus e protozoários, dentre os quais *Escherichia coli* diarreiogênica, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholerae* destacam-se como os principais agentes bacterianos (Kotloff et al., 2013).

*E. coli* compreende um grupo de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, os quais são caracterizados como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, que colonizam o trato gastrointestinal do homem e de outras espécies de animais (Ewing & Edwards, 1986). Esse patógeno faz parte da microbiota intestinal, coexistindo em harmonia com seus hospedeiros. Entretanto, durante o processo evolutivo dessas bactérias, alguns clones adquiriram, através de mecanismo de transferência horizontal de genes, uma série de fatores de virulência, contidos em ilhas de patogenicidade, plasmídeos, transposons e bacteriófagos, que lhes conferiram a capacidade de causar um amplo espectro de doenças tanto em indivíduos saudáveis, como imunocomprometidos (Nataro & Kaper, 1998; Kaper et al., 2004; Robins-Browne et al., 2016). Amostras patogênicas de *E. coli* têm sido associadas a infecções do trato gastrointestinal e a infecções extra-intestinais, tais como infecções urinárias, meningites e infecções sistêmicas (Kaper et al., 2004).

As amostras de *E. coli* associadas à infecções intestinais são denominadas de *E. coli* diarreiogênicas (ECD) e são classificadas em seis patotipos distintos, considerando-se os seus mecanismos específicos de virulência, o tipo de interação com linhagens celulares (HeLa ou HEp-2) cultivadas *in vitro*, e as síndromes clínicas que causam (Nataro & Kaper, 1998). Os patotipos de *E. coli* diarreiogênicas são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli*



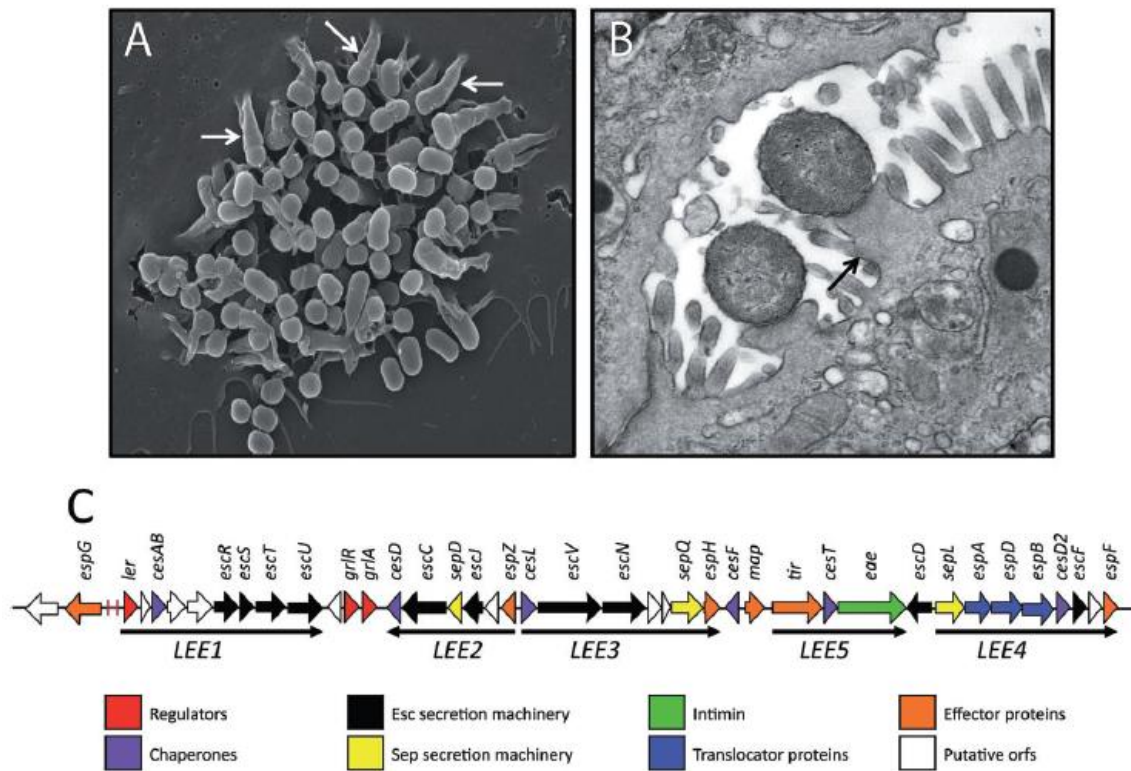
enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* que adere difusamente às células epiteliais (EAEC) (Nataro & Kaper, 1998; Kaper et al., 2004).

Embora essa classificação ainda seja utilizada, a complexidade desses patógenos vem sendo evidenciada pela subdivisão das EPEC e EAEC, em típicas e atípicas, bem como pelas EHEC que passaram a constituir um subgrupo do patotipo denominado *E. coli* produtora da toxina Shiga, STEC. (Croxen et al., 2013). Além do mais, o surgimento de amostras híbridas, com a capacidade de combinar características de virulência de diferentes patotipos, e que são potencialmente mais virulentas, pode ser observada devido à plasticidade do genoma de *E. coli* (Gomes et al., 2016).

O termo “*E. coli* enteropatogênica – EPEC” foi criado com o intuito de distinguir determinados sorogrupos de *E. coli* associados a casos de diarreia, de sorogrupos de *E. coli* encontrados na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis (Neter et al., 1955).

A principal característica de patogenicidade de EPEC é a produção de uma lesão histopatológica, denominada lesão *attaching and effacing* (lesão AE) (Moon et al., 1983), caracterizada pela aderência íntima da bactéria à membrana do enterócito, destruição das microvilosidades, além da formação de uma estrutura semelhante a um pedestal, rico em F-actina e outros elementos do citoesqueleto da célula hospedeira. (Knutton et al., 1989; Frankel et al., 1998).

A formação da lesão AE depende da expressão de genes cromossômicos presentes em uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* ou região LEE (McDaniel et al., 1995), e está organizada em cinco regiões de funções conhecidas: LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 e LEE4. Nas regiões LEE1, LEE2 e LEE3 encontram-se os genes que codificam o Sistema de Secreção do tipo 3 (SST3) e a proteína Ler (regulador global de LEE). Na região LEE4 encontram-se os genes que codificam as proteínas Esps (*E. coli secreted proteins*), que formam o translocon do SST3; e em LEE5 localizam-se os genes *eae* (que codificam a adesina Intimina) e *tir* (que codifica a proteína Tir), envolvidos na ligação íntima da bactéria à célula hospedeira, além de *cesT* (que codifica uma chaperona que auxilia na secreção e translocação do receptor Tir para o hospedeiro) (Kenny et al., 1997; Kenny, 1999; Garmendia et al., 2005). A figura 1 ilustra a lesão AE, bem como apresenta uma representação esquemática da região LEE de EPEC.

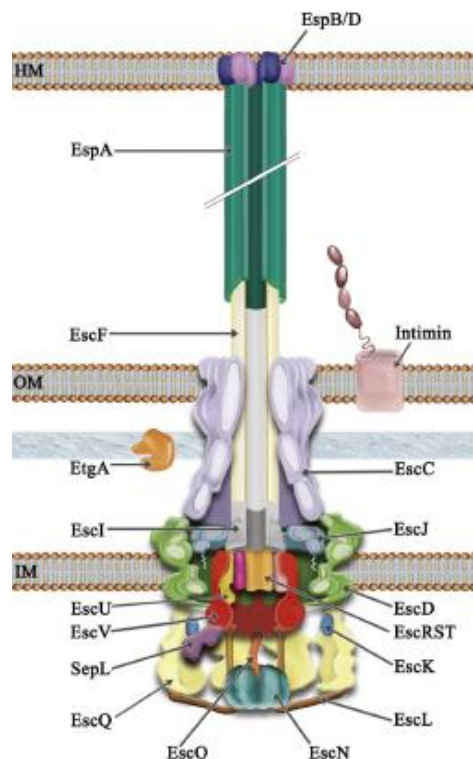


**Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura (A) e transmissão (B) mostrando o pedestal característico da lesão AE (seta) após interação com células epiteliais cultivadas *in vitro*. Representação esquemática da região LEE da amostra protótipo de EPEC típica E2348/69 (C). Extraído de Wong et al., 2011.

Embora essa região pareça ser altamente conservada, um estudo recente evidenciou a presença de 30 subtipos de LEE em 185 amostras de aEPEC provenientes da Ásia e da África, demonstrando que os fatores de virulência albergados nessa ilha de patogenicidade podem ter sido adquiridos por meio de transferência horizontal, em diferentes eventos evolutivos (Ingle et al., 2016).

O SST3 é composto por várias proteínas, entre as quais se destacam EscF e EspA, sendo que a primeira compreende um filamento, e a segunda, uma proteína que o reveste, podendo ter um comprimento variável dependente da quantidade disponível de EspA no citoplasma bacteriano (Knutton et al., 1998; Sekiya et al., 2001; Crepin et al., 2005). As proteínas EspB e EspD, por sua vez, são responsáveis pela formação de um poro na membrana da célula hospedeira para que ocorra a injeção de proteínas efetoras, e que associadas a EspA formam o

translocon do SST3, enquanto EscN funciona como uma ATPase, tendo papel fundamental na geração de energia para a biogênese desse sistema (Ide et al., 2001; Gauthier et al., 2003; Luo & Donnenberg, 2011). (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo 3 de patógenos capazes de induzir a lesão AE. Extraído de Gaytan et al., 2016.

Diferenças na eficiência de colonização e no tamanho do translocon do SST3 também puderam ser notadas quando domínios de EspB e EspD apresentavam variações nas sequências de alguns aminoácidos (Daniell et al., 2001). Uma diminuição na aderência de EPEC também foi descrita quando havia o bloqueio de determinadas regiões dessas proteínas com pequenos peptídeos (Li et al., 2016).

Intimina, uma proteína de membrana externa de 94 kDa, codificada pelo gene *eae*, é um fator de aderência que tem papel fundamental na colonização intestinal (Jerse et al., 1990). Essa proteína medeia ligação íntima às células epiteliais pela ligação a outra proteína codificada por LEE, o receptor translocado da intimina (Tir), que é injetado na célula do hospedeiro por meio do

SST3 (Kenny *et al.*, 1997). A molécula de Intimina é altamente variável em sua porção C-terminal, sendo que nos diferentes sorotipos de EPEC e STEC, pelo menos 35 variantes antigênicas foram descritas (Mora *et al.*, 2009).

Além de LEE, outras ilhas de patogenicidade (PAI) têm sido encontradas no cromossomo de bactérias capazes de induzir a lesão AE (Perna *et al.*, 2001; Iguchi *et al.*, 2009; Petty *et al.*, 2010). Estudos recentes têm demonstrado claramente que o repertório de proteínas translocadas pelo SST3, da célula bacteriana para a célula hospedeira, não se encontra restrito àquelas codificadas por genes localizados na região LEE. Essas proteínas são atualmente conhecidas como efetores não-LEE e estudos de virulência têm identificado serem esses efetores capazes de subverter vários processos relacionados às células hospedeiras, tais como: inibir o transporte de proteínas pelo retículo endoplasmático (EspI/NleA); inibir a resposta pro-inflamatória (NleB e NleE) e ativar Cdc42 e Rac1 para induzir a formação de *ruffle* de membrana e lamelipódio (EspT) (Vossenkömper *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2011). Outro efector não-LEE, denominado IQGAP1-*binding effector* (Ibe), foi identificado em uma amostra de EPEC, pertencente ao sorotipo O8:H, e mostrou participar da formação da lesão AE, embora a sua exata contribuição ainda não se encontre perfeitamente esclarecida (Buss *et al.*, 2009).

As EPEC são divididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC) tendo por base a presença do plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*) somente nas tEPEC (Kaper, 1996). O pEAF alberga um conjunto de 14 genes que são responsáveis por codificar as fímbrias BFP (*bundle-forming pilus*), responsáveis pela formação do padrão de adesão localizada (AL), que é caracterizado pela formação de microcolônias compactas na superfície de células epiteliais, após um período de interação de 3 horas (Scaletsky *et al.*, 1984; Girón *et al.*, 1991; Donnenberg *et al.*, 1992).

As aEPEC podem aderir ou não a células epiteliais em cultura, sendo que a maioria das amostras aderentes produz um padrão caracterizado pela presença de microcolônias mais frouxas, denominada AL-like (adesão semelhante à localizada), que são visualizadas somente em períodos de ensaios mais prolongados (Rodrigues *et al.*, 1996). Algumas amostras de aEPEC ainda podem aderir às células epiteliais em padrões característicos de outras categorias de ECD, tais como o padrão difuso (AD) de DAEC, no qual as bactérias aderem de forma randômica às células epiteliais, e o padrão agregativo (AA) de EAEC, onde é possível observar uma organização semelhante a tijolos empilhados tanto nas bactérias aderidas às superfícies epiteliais como na superfície abiótica (Vieira *et al.*, 2001; Dulguer *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2009).

Além da proteína intimina, aEPEC alberga genes responsáveis pela produção de outras adesinas fimbriais e afimbriais, cujas contribuições na interação desse patógeno com o hospedeiro vem sendo elucidada em diferentes estudos. A adesina afimbrial LDA (*locus for diffuse adherence*) foi, até o momento, a única estrutura de adesão descrita em uma amostra de aEPEC do sorotipo O26:H11 e parece ser responsável por produzir o padrão de adesão difuso quando seus determinantes genéticos são clonados em uma amostra laboratorial de *E. coli* não aderente (Scaletsky et al., 2005). Além do locus *lda*, genes responsáveis por codificar adesinas descritas em outros patótipos de ECD, como no patótipo de *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), também têm sido observados em aEPEC. Dentre esses genes podemos destacar: *paa* (porcine A/E-associated adhesin), *iha* (IrgA homologue adhesin), *toxB* (ToxB de EHEC) e *efal/lifA* (EHEC factor for adherence), além dos operons *ecp* (*E. coli* common pilus), *fim* (pilus tipo I) e *lpf* (long polar fimbriae) que codificam adesinas fimbriais (Scaletsky et al., 2009; Gomes et al., 2011; Hernandez et al., 2011; Torres et al., 2009). A ocorrência de genes que codificam proteínas autotransportadoras exercendo papel na interação bacteriana com células hospedeiras, também já foi reportada em amostras de aEPEC, dentre os quais podemos citar: *cah* (calcium-binding antigen), que possui papel na formação de biofilme e autoagregação, além *ehaA* (EHEC autotransporter A), *ehaB* (EHEC autotransporter B), *ehaD* (EHEC autotransporter D), *ehaJ* (EHEC autotransporter J) e *sab* (STEC autotransporter), que também atuam na formação de biofilme (Abreu et al., 2013). O gene *paa* tem sido observado mais frequentemente entre amostras de aEPEC provenientes das fezes de indivíduos diarreicos, do que das fezes de indivíduos saudáveis, mostrando uma associação com doença diarreica (Afset et al., 2006; Scaletsky et al., 2009; Gomes et al., 2011). Entre as adesinas fimbriais, pouco sabemos além da distribuição de genes responsáveis por codificar proteínas associadas à biogênese dessas estruturas, apesar do fato da produção da adesina ECP ter sido demonstrada em aEPEC aderidas a células epiteliais (HeLa) cultivadas *in vitro* (Hernandez et al., 2011). Outra estrutura bacteriana que parece contribuir para a interação de aEPEC com os enterócitos é o flagelo, sendo essa ligação mediada pela proteína FliD (Sampaio et al., 2016). Um estudo recente identificou uma amostra de aEPEC do sorotipo O26:H11 capaz de aderir as células epiteliais mesmo na ausência da interação entre a adesina intimina e seu receptor translocado Tir (Santos et al., 2019). Essa aderência, independente da adesina Intimina, foi atribuída ao translocon do SST3 após análise de mutantes nos genes *escN* e *espD* (Santos et al., 2019). O papel do translocon do SST3 na

interação bactéria-célula hospedeira já havia sido descrito em estudos anteriores realizados com uma amostra de *E. albertii* (Hernandes et al., 2013). Embora trabalhos de caracterização já tenham evidenciado a presença de genes responsáveis por codificarem adesinas fimbriais e afimbriais em amostras de aEPEC (Scaletsky et al., 2005; Hernandez et al., 2011), pouco se conhece sobre a produção dessas proteínas e sua importância na colonização intestinal.

Uma vez que o papel das aEPEC na doença diarreica ainda se encontra em fase de importantes questionamentos, esforços para compreender as ferramentas de virulência de amostras que foram responsáveis por surtos, e têm assim seu potencial patogênico claramente evidenciado, são iniciativas de elevada importância. Recordando um surto ocorrido na Alemanha, o qual foi causado por uma amostra do sorotipo O104:H4 capaz de produzir concomitantemente a toxina Stx2a e uma adesina agregativa AAF/I (*Aggregative Adhesion Fimbria*), onde mais de 4000 indivíduos diarreicos foram relatados, dentre os quais 54 foram a óbito (Bielaszewska et al., 2011). Estudos realizados no nosso laboratório contribuíram para identificar potenciais sorotipos de aEPEC envolvidos em surtos ocorridos no Brasil. Nesse estudo reportamos um surto ocorrido em uma creche, localizada na cidade de São José do Rio Preto, causado por aEPEC do sorotipo O2:H16 (Vieira et al., 2016). Posterior caracterização dessas amostras demonstrou que esse patógeno alberga vários fatores de virulência, incluindo genes responsáveis por codificar adesinas fimbriais e afimbriais, bem como interagir eficientemente com células HeLa, produzindo um padrão híbrido de aderência, denominado AL/AD, e promovendo o acúmulo de F-actina abaixo do local de aderência à célula hospedeira (Vieira et al., 2016; Vieira et al., 2019). Dessa forma, capacidade de aderir fortemente às células epiteliais pode reforçar as características de virulência de determinadas amostras de aEPEC, tornando-os capazes de provocar surtos de importância para as autoridades competentes em saúde pública e para toda a população afetada.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou o potencial de amostras de aEPEC do sorotipo O2:H16 em interagir, invadir e induzir o acúmulo de actina, característico da lesão AE, em células epiteliais infectadas. Ademais, pôde-se evidenciar a importância da interação intimina-Tir para o estabelecimento do fenótipo híbrido de adesão AL/AD, observado em uma amostra selecionada de aEPEC, do sorotipo O2:H16, quando em contato com células epiteliais cultivadas *in vitro*.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Abe CM, Trabulsi LR, Blanco J, Blanco M, Dahbi G, Blanco JE, Mora A, Franzolin MR, Taddei CR, Martinez MB, Piazza RM, Elias WP (2009) Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*<sup>+</sup> EAF-negative *stx*<sup>-</sup> genetic profile. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64:357-365.
2. Abreu AG, Bueris V, Porangaba TM, Sircili MP, Navarro-Garcia F, Elias WP (2013) Autotransporter protein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 79:411-414.
3. Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, Bergh K (2006) Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J Clin Microbiol* 44:3703-3711.
4. Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC, Moon HW (1983) Plasmid mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2:534-538.
5. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H (2011) Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 11:671-676
6. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 24:1513-1523.
7. Black RE, Morris SS, Bryce J (2003) Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*. 361:2226-34.
8. Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, Madrid C, Juárez A, Bernárdez MI, González EA, Blanco J (2006) Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol* 9:103-110.



9. Bromberg Y, Rost B (2007) SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res* 35:3823–3835.
10. Buss C, Müller D, Rüter C, Heusipp G, Schmidt MA (2009) Identification and characterization of Ibe, a novel type III effector protein of A/E pathogens targeting human IQGAP1. *Cell Microbiol* 11:661-677.
11. Campellone KG, Robbins D, Leong JM (2004) EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell* 7:217-228.
12. Carvalho HM, Teel LD, Kokai-Kun JF, O'Brien AD (2005). Antibody against the carboxyl terminus of intimin alpha reduces enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to tissue culture cells and subsequent induction of actin polymerization. *Infect Immun* 73:2541-2546.
13. Chatterjee A, Caballero-Franco C, Bakker D, Totten S, Jardim A (2015) Pore-forming Activity of the *Escherichia coli* Type III Secretion System Protein EspD. *J Biol Chem* 290:25579-25594.
14. Chaverroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C (2000) A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28:E97.
15. Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150:527-538.
16. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 3:95–99.

17. Crepin VF, Shaw R, Abe CM, Knutton S, Frankel G (2005) Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. *J Bacteriol* 187:2881-2889.
18. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26:822-880.
19. Daniell SJ, Delahay RM, Shaw RK, Hartland EL, Pallen MJ, Booy F, Ebel F, Knutton S, Frankel G (2001) Coiled-coil domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis. *Infect Immun* 69:4055-4064.
20. Dasanayake D, Richaud M, Cyr N, Caballero-Franco C, Pittroff S, Finn RM, Ausió J, Luo W, Sonnenberg MS, Jardim A (2011) The N-terminal amphipathic region of the *Escherichia coli* type III secretion system protein EspD is required for membrane insertion and function. *Mol Microbiol* 81:734-750.
21. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640-6645.
22. DeVinney R, Puente JL, Gauthier A, Goosney D, Finlay BB (2001) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol* 41:1445-1458.
23. Sonnenberg MS, Girón JA, Nataro JP, Kaper JB (1992) A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 6:3427-3437.
24. Dulguer MV, Fabbriotti SH, Bando SY, Moreira-Filho CA, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC (2003) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. *J Infect Dis* 188:1685-1694.

25. Elliott SJ, Kaper JB (1997) Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. *Microb Pathog* 23:113-118.
26. Ewing WH, Edwards PR (1986) *Edwards & Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. New York: Elsevier 4 ed:536.
27. Frankel G, Philips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*; more subversive elements. *Mol Microbiol* 30:911-921.
28. Garcia BG, Ooka T, Gotoh Y, Vieira MA, Yamamoto D, Ogura Y, Girão DM, Sampaio SC, Melo AB, Irino K, Hayashi T, Gomes TA (2016) Genetic relatedness and virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains of serotype O119:H6 expressing localized adherence or localized and aggregative adherence-like patterns on HeLa cells. *Int J Med Microbiol* 306:152-164.
29. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 73:2573-2585.
30. Garmendia J, Phillips AD, Carlier MF, Chong Y, Schüller S, Marches O, Dahan S, Oswald E, Shaw RK, Knutton S, Frankel G (2004) TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* 6:1167-1183.
31. Gauthier A, Puente JL, Finlay BB (2003) Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* 71:3310-3319.

32. Gaytán MO, Martínez-Santos VI, Soto E, González-Pedrajo B (2016) Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 21:6-129.
33. Girón JA, Ho AS, Schoolnik GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254:710-713.
34. Gomes TAT, Hernandez RT, Torres AG, Salvador FA, Guth BE, Vaz TM, Irino K, Silva RM, Vieira MAM (2011) Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. *J Clin Microbiol* 49:3334-3337.
35. Gomes TAT, Yamamoto D, Vieira MAM, Hernandez RT. *Escherichia coli* in the Americas: Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Editado por: Alfredo G. Torres (2016) Springer 1 ed 4:77-96.
36. Hancock V, Witsø IL, Klemm P (2011) Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *Int J Med Microbiol* 301:570–576.
37. Hazen TH, Rasko, DA (2019). Complete genome of the atypical enteropathogenic *Escherichia coli* archetype isolate E110019 highlights a role of plasmids in dissemination of the type III secreted effector EspT. *Infect Immun* [Epub ahead of print].
38. Hernandez RT, Silva RM, Carneiro SM, Salvador FA, Fernandes MC, Padovan AC, Yamamoto D, Mortara RA, Elias WP, da Silva Briones MR, Gomes TA (2008) The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. *Cell Microbiol* 10:415-425
39. Hernandez RT, Velsko I, Sampaio SC, Elias WP, Robins-Browne RM, Gomes TA, Girón JÁ (2011) Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 77:8391-8399.

40. Hernandez RT, De la Cruz MA, Yamamoto D, Girón JA, Gomes TA (2013) Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 81:3793-3802.
41. Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H, Schmidt MA (2001) Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3:669-679.
42. Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, Kenny B, Quail MA, Thurston S, Dougan G, Hayashi T, Parkhill J, Frankel G (2009) Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* 191:347-354.
43. 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 I, Ramamurthy T, Hossain A, Kotloff KL, Nataro JP, Dougan G, Levine MM, Robins-Browne RM, Holt KE (2016) Evolution of atypical enteropathogenic *E. coli* by repeated acquisition of LEE pathogenicity island variants. *Nat Microbiol* 1:15010.
44. Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7839-7843.
45. Jønsson R, Struve C, Boisen N, Mateiu RV, Santiago AE, Jenssen H, Nataro JP, Krogfelt KA (2015) A novel Aggregative Adherence Fimbriae (AAF/V) of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). *Infect Immun* 83:1396-1405.
46. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123-140.
47. Kaper JP (1996) Defining EPEC. *Rev Microbiol* 27:130-133.

- 48.Kaper JB & O'Brien AD (2014) Overview and Historical Perspectives. *Microbiol* 2.
- 49.Kenny B (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* 31:1229-1241.
- 50.Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91:511-520.
- 51.Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B (2009) Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 18:580-592.
- 52.Knutton S, Phillips AD, Smith HR, Gross RJ, Shaw R, Watson P, Price E (1989) Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. *Infect Immun* 59:365-371.
- 53.Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G, Frankel G (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* 17:2166-2176.
- 54.Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omore R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM (2013) Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382:209-222.

55. Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, O'Brien AD (1985) The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* 152:550-559.
56. Li D, Chen Z, Cheng H, Zheng JX, Pan WG, Yang WZ, Yu ZJ, Deng QW (2016) Inhibition of Adhesion of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells by Binding of a Novel Peptide to EspB Protein. *Curr Microbiol* 73:361-365.
57. Luo W, Donnenberg MS (2011) Interactions and predicted host membrane topology of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocator protein EspB. *J Bacteriol* 193:2972-2980.
58. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1664-1668.
59. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 41:1340-1351.
60. Mora A, Blanco M, Yamamoto D, Dahbi G, Blanco JE, López C, Alonso MP, Vieira MA, Hernandez RT, Abe CM, Piazza RM, Lacher DW, Elias WP, Gomes TA, Blanco J (2009) HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. *Int Microbiol* 12:243-251.
61. Moreira CG, Carneiro SM, Nataro JP, Trabulsi LR, Elias WP (2003) Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 226:79-85.

62. 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 (2018) Distribution of Major Pilin Subunit Genes Among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Influence of Growth Media on Expression of the ecp Operon. *Front Microbiol* 15:9-942.
63. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142-201.
64. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gino RM, Gorzynski EA (1955) Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics* 16:801-808.
65. Ooka T, Vieira MA, Ogura Y, Beutin L, La Ragione R, van Diemen PM, Stevens MP, Aktan I, Cawthraw S, Best A, Hernandez RT, Krause G, Gomes TA, Hayashi T, Frankel G (2007) Characterization of tccP2 carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 271:126-135.
66. Ori EL, Takagi EH, Andrade TS, Miguel BT, Cergole-Novella MC, Guth BEC, Hernandez RT, Dias RCB, Pinheiro SRS, Camargo CH, Romero EC, Dos Santos LF (2018) Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. *Epidemiol Infect* 19:1-9.
67. Pacheco VC, Yamamoto D, Abe CM, Hernandez RT, Mora A, Blanco J, Gomes TA (2014) Invasion of differentiated intestinal Caco-2 cells is a sporadic property among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying common intimin subtypes. *Pathog Dis* 70: 167–175.
68. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC (2001). 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* 69:6999-7009.



69. Pelayo JS, Scaletsky IC, Pedroso MZ, Sperandio V, Girón JA, Frankel G, Trabulsi LR (1999) Virulence properties of atypical EPEC strains. *J Med Microbiol* 48:41-49.
70. Perna NT, Plunkett G. 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Pósfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dilamanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O:157:H7. *Nature* 409:529-533.
71. Petty NK, Bulgin R, Crepin VF, Cerdeño-Tárraga AM, Schroeder GN, Quail MA, Lennard N, Corton C, Barron A, Clark L, Toribio AL, Parkhill J, Dougan G, Frankel G, Thomson NR (2010) The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 192:525-538.
72. Phillips AD, Frankel G (2000) Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* 181:1496-1500.
73. Robins-Browne RM, Holt KE, Ingle DJ, Hocking DM, Yang J, Tauschek M (2016) Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Front Cell Infect Microbiol* 18:6-141.
74. Rodrigues J, Scaletsky IC, Campos LC, Gomes TA, Whittam TS, Trabulsi LR (1996) Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun* 64:2680-2686.
75. Sahl JW, Caporaso JG, Rasko DA, Keim P (2014) The large-scale blast score ratio (LS-BSR) pipeline: a method to rapidly compare genetic content between bacterial genomes. *Peer J* 2:e332.
76. Sampaio SCF, Moreira FC, Liberatore AMA, Vieira MAM, Knobl T, Romão FT, Hernandez RT, Ferreira CSA, Ferreira AP, Felipe-Silva A, Sinigaglia-Coimbra R, Koh IHJ, Gomes TAT

(2014) 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 2014:1-9.

77.Sampaio SC, Luiz WB, Vieira MA, Ferreira RC, Garcia BG, Sinigaglia-Coimbra R, Sampaio JL, Ferreira LC, Gomes TA (2016) Flagellar Cap Protein FliD Mediates Adherence of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* to Enterocyte Microvilli. Infect Immun 84:1112-1122.

78.Santos FF, Yamamoto D, Abe CM, Bryant JA, Hernandez RT, Kitamura FC, Castro FS, Valiatti TB, Piazza RMF, Elias WP, Henderson IR, Gomes TAT (2019) The Type III Secretion System (T3SS)-Translocon of Atypical *Enteropathogenic Escherichia coli* (aEPEC) Can Mediate Adherence. Front Microbiol 9:10-1527.

79.Scaletsky IC, Aranda KR, Souza TB, Silva NP (2010) Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. J Clin Microbiol 48:302–306.

80.Scaletsky IC, Aranda KR, Souza TB, Silva NP, Morais MB (2009) Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 47:3756-3759.

81.Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect Immun 45:534-536.

82.Scaletsky IC, Michalski J, Torres AG, Dulguer MV, Kaper JB (2005) Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 73:4753-4765.

83.Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, Abe A (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 25:11638-11643.

84. Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C (2001) *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 69:6660-6669.
85. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M (2003) Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 41:2669-2671.
86. Torres AG, Blanco M, Valenzuela P, Slater TM, Patel SD, Dahbi G, López C, Barriga XF, Blanco JE, Gomes TA, Vidal R, Blanco J (2009) Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. *J Clin Microbiol* 47:2442-2451.
87. Torres AG, Zhou X, Kaper JB (2005) Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 73:18-29.
88. United Nations Children's Fund- UNICEF. One is too many: Ending child deaths from pneumonia and diarrhoea (2016). <https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2016/11/UNICEF-Pneumonia-Diarrhoea-report2016-web-version.pdf>
89. Vieira MA, Dias RCB, Dos Santos LF, Rall VLM, Gomes TAT, Hernandez RT (2019) Diversity of strategies used by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to induce attaching and effacing lesion in epithelial cells. *J Med Microbiol* 68:940-951.
90. Vieira MA, Dos Santos LF, Dias RC, Camargo CH, Pinheiro SR, Gomes TA, Hernandez RT (2016) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. *J Med Microbiol* 65:998-1006.
91. Vieira MAM, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa AC, Dias AM, Ramos SR, Frankel G, Gomes TAT (2001) 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* 183:762-772.

92. Viljanen MK, Peltola T, Junnila SY, Olkkonen L, Jarvinen H, Kuistila M, Huovinen P (1990) Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *Lancet* 336:831-834.

93. Vossenkämper A, Macdonald TT, Marchès O (2011) Always one step ahead: how pathogenic bacteria use the type III secretion system to manipulate the intestinal mucosal immune system. *J Inflamm (LOND)* 3:8–11.

94. Whale AD, Hernandez RT, Ooka T, Beutin L, Schüller S, Garmendia J, Crowther L, Vieira MA, Ogura Y, Krause G, Phillips AD, Gomes TA, Hayashi T, Frankel G (2007) TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 153:1743-1755.

95. Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, Frankel G, Hartland EL (2011) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol Microbiol* 80:1420-1438.

96. World Health Organization- WHO. Diarrhoeal disease/ Fact sheet (2017). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>

97. Yamamoto D, Hernandez RT, Liberatore AM, Abe CM, Souza RB, Romão FT, Sperandio V, Koh IH, Gomes TA (2017) *Escherichia albertii*, a novel human enteropathogen, colonizes rat enterocytes and translocates to extra-intestinal sites. *PLoS One* 12:e0171385.

98. Zambelloni R, Connolly JPR, Huerta Uribe A, Burgess K, Marquez R, Roe AJ (2017) Novel compounds targeting the enterohemorrhagic *Escherichia coli* type three secretion system reveal insights into mechanisms of secretion inhibition. *Mol Microbiol* 105:606-619.