

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/04/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*
ENTEROAGREGATIVA DO SOROTIPO O3:H2 OBTIDOS DE
DIFERENTES FONTES DE INFECÇÃO NO HOSPEDEIRO
HUMANO

BRUNA MENDES LUIZ

ORIENTADOR: RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

BOTUCATU – SP

2025

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*
ENTEROAGREGATIVA DO SOROTIPO O3:H2 OBTIDOS DE
DIFERENTES FONTES DE INFECÇÃO NO HOSPEDEIRO
HUMANO

BRUNA MENDES LUIZ

ORIENTADOR: RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no Programa de
Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

Área de concentração: Biologia e Patogenicidade
de Micro-organismos, Imunidade e
Imunomodulação.

Orientador: *Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez*

BOTUCATU – SP

2025

L953c Luiz, Bruna Mendes

Caracterização de isolados de Escherichia coli enteroagregativa do sorotipo O3:H2 obtidos de diferentes fontes de infecção no hospedeiro humano / Bruna Mendes Luiz. -- Botucatu, 2025

95 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

1. Microbiologia. 2. Bacteriologia. 3. Patogenicidade bacteriana. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Título da dissertação: Caracterização de isolados de *Escherichia coli* enteroagregativa do sorotipo O3:H2 obtidos de diferentes fontes de infecção no hospedeiro humano

Impacto científico: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) do sorotipo O3:H2 tem sido isolada tanto de pacientes com diarreia bem como de pacientes com infecções do trato urinário (ITU). Nosso estudo mostrou diferenças genotípicas relevantes entre esses isolados no que diz respeito a presença de genes codificando fatores de virulência, indicando a participação de fatores de virulência específicos para o sucesso das ITU.

Impacto econômico e social: As infecções por *Escherichia coli* são comuns em humanos, o que leva a grandes gastos econômicos nos sistemas de saúde em todo o mundo, tanto com casos de infecções diarreioagênicas quanto infecções extra intestinais, como as infecções do trato urinário (ITU). A bactéria *Escherichia coli* do sorotipo O3:H2 já foi reportada na literatura como sendo isolada tanto de amostras de fezes de indivíduos com e sem diarreia, como de amostras de urina de pacientes com ITU. Essas bactérias têm sido classificadas como híbridos de EAEC/ExPEC. Nossos dados mostraram genes codificando fatores de virulência exclusivos das bactérias causadoras de ITU. No futuro esses fatores de virulência poderão constituir importantes alvos a serem atacados para o controle dessas infecções em indivíduos susceptíveis.

Potential impact of this research

Thesis Title: Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from O3:H2 serotype obtained from different sources of infection in the human host

Scientific impact: Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) of serotype O3:H2 has been isolated from both diarrheal and urinary tract infection (UTI) patients. Our study showed relevant genotypic differences between these isolates regarding the presence of genes encoding virulence factors, decreasing the participation of specific virulence factors in the success of UTI.

Economic and social impact: *Escherichia coli* infections are common in humans, leading to significant economic costs in health systems worldwide, as many cases of diarrheagenic infections as extraintestinal infections, such as urinary tract infections (UTIs). *Escherichia coli* of serotype O3:H2 has been reported in the literature as being isolated from stool samples of individuals with and without diarrhea, as well as from urine samples of patients with UTI. These bacteria have been classified as EAEC/ExPEC hybrids. Our data showed genes encoding virulence factors unique to the bacteria that cause UTI. In the future, these virulence factors may constitute important targets to be attacked for the control of these infections in susceptible individuals.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização de isolados de *Escherichia coli* enteroagregativa do sorotipo O3:H2 obtidos de diferentes fontes de infecção no hospedeiro humano.

AUTORA: BRUNA MENDES LUIZ

ORIENTADOR: RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia de Micro-organismos e Imunidade pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES (Participação Presencial)
Departamento de Genética e Microbiologia e Imunologia - Setor de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. ROXANE MARIA FONTES PIAZZA (Participação Presencial)
Laboratório de Bacteriologia / Instituto Butantan

Profa. Dra. VERA LUCIA MORES RALL (Participação Presencial)
Departamento de Genética e Microbiologia e Imunologia - Setor de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu da UNESP

Botucatu, 30 de abril de 2025



Documento assinado digitalmente
FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Data: 06/05/2025 10:50:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

O presente estudo foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo nº 2023/10536-7 e Projeto Temático 2017/14821-7 desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada (área de concentração: Biologia e Patogenicidade de Micro-organismos, Imunidade e Imunomodulação.), no Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia , do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, meus avós que incentivaram meus pais a seguir os estudos e passaram estes valores para mim.

A minha mãe Ana Maria, meu pai Sidnei e meu irmão Gabriel, obrigada por me apoiarem neste caminho da pós-graduação e todo o amor envolvido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes, pela oportunidade de integrar o Laboratório de Patogenicidade Bacteriana (LPB) desde a minha iniciação científica até o meu mestrado e por toda a orientação durante este período.

A todos os técnicos e funcionários do Setor de Microbiologia/Imunologia, pela disponibilização dos materiais e estrutura necessários para realizar este estudo, além de orientações sobre os protocolos.

Também gostaria de agradecer em especial a todos os meus amigos e colegas do LPB e Setor de Microbiologia e Imunologia, Daiany, Iranildo, Henrique, Guilherme, Beatrice, Luisa, Francisco, Stefani e Emilly por toda a cooperação e sugestões acerca dos experimentos neste trabalho, além da companhia durante estes anos.

A todos os parceiros que auxiliaram cedendo parte dos isolados e auxiliando na elaboração deste estudo, Prof. Dr. Luis Fernando dos Santos, Profa. Dra. Maria Cecília Cergole-Novella, Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior e Profa. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral.

A Cefar, pela doação dos discos de antibióticos utilizados nesta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2023/10536-7 e Projeto Temático 2017/14821-7) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um dos seis patótipos de *E. coli* diarreiogênica, caracterizado pela formação do padrão de aderência agregativa (AA) em células epiteliais infectadas. Além de ser um importante agente etiológico de doença diarreica, isolados de EAEC também têm sido associados a infecções extraintestinais, como infecções do trato urinário e bacteremia. Isolados de *E. coli* que apresentam genes pertencentes a diferentes grupos patogênicos têm sido recentemente denominados, na literatura, como isolados híbridos. Entre esses, destacam-se os isolados de EAEC do sorotipo O3:H2. Neste contexto, nosso estudo teve como objetivo caracterizar, fenotípica e molecularmente, 10 isolados de EAEC do sorotipo O3:H2, obtidos tanto de amostras clínicas de fezes (7 isolados) quanto de urina (3 isolados). Os isolados analisados demonstraram heterogeneidade em diversas características fenotípicas, incluindo: formação de biofilme, aderência a células uroteliais T24, produção de fimbria tipo 1, autoagregação e resistência a múltiplos antimicrobianos. A análise do pan e do core genoma, desses 10 isolados sequenciados na plataforma Illumina, revelou um total de 6,033 clusters de genes, dos quais 4,032 pertencem ao core genoma. Os isolados de EAEC O3:H2 provenientes de urina compartilharam 74 clusters de genes exclusivos desse grupo, incluindo os genes do operon *afa*. Este achado foi confirmado por meio do sequenciamento completo do genoma de dois isolados do sorotipo O3:H2: um oriundo de fezes (041-2) e outro de urina (UPEC-34). Análises posteriores indicaram que o operon *afa* está localizado em uma ilha de patogenicidade (PAI) cromossomal. Mutações nos operons *aggDCBA* e *afaABCDE-V*, que codificam respectivamente as adesinas AAF/I e AfaE-V, no isolado UPEC-34, demonstraram que a mutação em *aggDCBA* reduziu a formação de biofilme. Além disso, o fenótipo de autoagregação não foi observado em nenhum dos dois mutantes testados. Curiosamente, os mutantes não apresentaram redução qualitativa na aderência às células uroteliais T24. Coletivamente, nossos dados demonstram que os isolados de EAEC do sorotipo O3:H2 são genotípica e fenotipicamente heterogêneos, o que pode contribuir para sua capacidade de adaptação a diferentes nichos do hospedeiro e, consequentemente, para a manifestação de distintos quadros clínicos.

Palavras-chave: Microbiologia, Bacteriologia, Patogenicidade bacteriana, UPEC, EAEC, híbridos.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is one of six pathotypes of diarrheagenic *E. coli*, characterized by the formation of an aggregative adherence (AA) pattern in infected epithelial cells. In addition to being an important etiological agent of diarrheal diseases, EAEC isolates have also been associated with extraintestinal infections, such as urinary tract infections and bacteremia. *E. coli* isolates harboring genes belonging to different pathogenic groups have recently been referred to in the literature as hybrid isolates. Among these, EAEC isolates of serotype O3:H2 stand out. In this context, our study aimed to characterize, phenotypically and molecularly, 10 EAEC isolates of serotype O3:H2, obtained from both clinical stool (7 isolates) and urine (3 isolates) samples. The analyzed isolates demonstrated heterogeneity in several phenotypic characteristics, including biofilm formation, adherence to T24 urothelial cells, type 1 fimbria production, autoaggregation, and resistance to multiple antimicrobials. A pan and core genome analysis of these 10 isolates sequenced on the Illumina platform revealed a total of 6,033 gene clusters, of which 4,032 belong to the core genome. The EAEC O3:H2 isolates obtained from urine shared 74 gene clusters unique to this group, including the *afa* operon genes. This finding was confirmed by the whole-genome sequencing of two isolates of serotype O3:H2: one from stool samples (041-2) and the other from urine (UPEC-34). Further analysis indicated that the *afa* operon is located on a chromosomal pathogenicity island (PAI). Mutations in the *aggDCBA* and *afaABCDE-V* operons, which encode AAF/I and AfaE-V adhesins, respectively, in the UPEC-34 isolate revealed that the *aggDCBA* mutation reduce biofilm formation. Furthermore, the autoaggregation phenotype was not observed in either of the two mutants tested. Interestingly, the mutants did not show a qualitative reduction in adhesion to T24 urothelial cells. Collectively, our data demonstrate that EAEC isolates of serotype O3:H2 are genotypically and phenotypically heterogeneous, which may contribute to their ability to adapt to different host niches and, consequently, to the manifestation of different clinical presentations.

Keywords: UPEC, EAEC, hybrids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teste de aglutinação com <i>Saccharomyces boulardii</i>	33
Figura 2. Produção de biofilme entre isolados EAEC do sorotipo O3:H2.....	34
Figura 3. Perfil de adesão dos isolados O3:H2 em interação com células uroteliais T24.....	35
Figura 4. Padrão de autoagregação entre os 10 isolados EAEC do sorotipo O3:H2.....	36
Figura 5. Análise do pan e core genoma dos isolados de EAEC do sorotipo O3:H2 obtidos de amostras de fezes e urina.....	40
Figura 6. Detecção de genes de virulência nos isolados de <i>E. coli</i> do sorotipo O3:H2 através do banco de dados da ferramenta VirulenceFinder.....	44
Figura 7. Detecção de genes de resistência nos isolados de <i>E. coli</i> do sorotipo O3:H2 através do banco de dados da ferramenta ResFinder.....	46
Figura 8. Comparação cromossômica entre o isolado obtido de amostra de diarreia 041-2 e o isolado UPEC-34 obtido de um caso de ITU.....	49
Figura 9. Ilhas de patogenicidade encontradas no genoma de UPEC-34 segundo a ferramenta IslandViewer4.....	51
Figura 10. Comparação nucleotídica entre as regiões comuns encontradas no pAA dos isolados 041-2 e UPEC-34.....	55
Figura 11. Representação dos plasmídeos (pAA) encontrado nos isolados UPEC-34 e 041-2.....	58
Figura 12. Os isolados UPEC-34 de urina e 041-2 de diarreia albergam o plasmídeo pAA...60	60
Figura 13. Reações de confirmação dos principais marcadores genotípicos de UPEC-34 e dos mutantes gerados.....	61
Figura 14. Sequenciamento Sanger realizado com o isolado mutante em <i>aggDCBA</i> e <i>afaABCDE</i>	62
Figura 15. Curva de crescimento realizada com os isolados UPEC-34 selvagem e mutante no operon <i>aggDCBA</i>	63
Figura 16. A deleção de <i>aggDCBA</i> causou redução nos níveis de produção de biofilme de UPEC-34.....	64
Figura 17. Níveis de autoagregação bacteriana de UPEC-34 selvagem e seus respectivos mutantes.....	65
Figura 18. A deleção dos operons <i>aggDCBA</i> e <i>afaABCDE</i> não causou diferenças na adesão do isolado UPEC-34 em células uroteliais.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de EAEC do sorotipo O3:H2 obtidos de amostras de fezes e urina utilizados neste estudo.....	23
Tabela 2: Sequência dos iniciadores utilizados para mutagênese dos operons <i>aggDCBA</i> e <i>afaABCDE</i> em UPEC-34.....	30
Tabela 3. Sequência dos iniciadores utilizados para confirmação de marcadores de virulência típicos de EAEC e UPEC nos isolados UPEC-34 selvagem e mutante.....	31
Tabela 4. Iniciadores utilizados para confirmação da mutagênese realizada.....	32
Tabela 5. Perfil de resistência observado nos isolados EAEC do sorotipo O3:H2.....	37
Tabela 6. Características dos sequenciamentos genômicos por <i>short reads</i> Illumina realizados dos isolados de <i>E. coli</i> patogênica pertencentes ao sorotipo O3:H2.....	38
Tabela 7. Análises classificatórias <i>in silico</i> dos isolados de <i>E. coli</i> do sorotipo O3:H2 estudados.....	39
Tabela 8. Lista de genes exclusivamente compartilhados entre os isolados obtidos de amostras de urina UPEC-34, HSP 425 e 24/657.....	41
Tabela 9. Distribuição dos genes classificatórios de ExPEC nos isolados O3:H2.....	43
Tabela 10. Moléculas de DNA cromossomal e plasmidial dos isolados representativos do sorotipo O3:H2 estudados.....	47
Tabela 11. Distribuição de genes de virulência e resistência entre o genoma de UPEC-34	48
Tabela 12. Distribuição de genes de virulência e resistência entre o genoma de 041-2.....	48
Tabela 13. Genes localizados na ilha genômica que alberga o operon <i>afaABCDE</i>	49
Tabela 14. Identificação de Ilhas de Patogenicidade cromossomais (PAIs) presentes no isolado UPEC/EAEC UPEC-34 encontradas em pelo menos um preditor.....	51
Tabela 15. Identificação de profagos dentro do cromossomo de UPEC-34.....	53
Tabela 16. Os isolados de EAEC O3:H2 possuem similaridades entre seus plasmídeos.....	54
Tabela 17. Características do pAA dos isolados 041-2 e UPEC-34.....	54
Tabela 18. Lista de genes encontrados no pAA de 041-2 e UPEC-34.....	55
Tabela 19. Confirmação por PCR em UPEC-34 selvagem e mutantes.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aderência agregativa
AAF	Fímbria de aderência agregativa
Afa/Dr	Família de adesinas Afa/Dr
AFP	<i>Aggregative-forming pilus</i>
cAMP	AMP cíclico
cGMP	GMP cíclico
CIBs	Comunidades intracelulares bacterianas
CNF-1	<i>Cytotoxic necrotizing factor-1</i>
D.O.	Densidade óptica
DAEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de aderência difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreio gênica
DMEM	Meio Dulbecco
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST-1	<i>Enteraggative Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin 1</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra intestinal
F1C	Adesina fimbrial F1C
FT1	Fímbria do tipo 1
FV	Fator de virulência
GV	Gene de virulência
HGT	Transferência horizontal de genes
ITU	Infecção do trato urinário
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MNEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de meningite neonatal
pAA	Plasmídeo de aderência agregativa
PBS	Tampão fosfato-salina
Pet	<i>Plasmid-encoded toxin</i>
Pic	<i>Protein involved in colonization</i>
S	Adesina fimbrial S
SDD	Suscetível dose-dependente
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de sepse
SFB	Soro Fetal Bovino
ShET1	<i>Shigella-enterotoxin-1</i>
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
WGS	Sequenciamento de genoma completo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Isolados de EAEC do sorotipo O3:H2	22
2.2 Teste de aglutinação com <i>Sacharomices boulardii</i>	23
2.3 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica	24
2.4 Cultivo celular com a linhagem urotelial T24	24
2.5 Teste de adesão com a linhagem urotelial T24	25
2.6 Ensaio de autoagregação	25
2.7 Perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados do sorotipo O3:H2	26
2.8 Sequenciamento <i>short reads</i> Illumina	26
2.8.1 Detecção do sorotipo, filogrupos, MLST e <i>fimH</i> dos isolados	27
2.8.2 Análises do Pan Genoma	27
2.8.3 Detecção de genes de virulência e resistência presentes no genoma dos isolados	27
2.9 Sequenciamento <i>long reads</i> Nanopore e montagem híbrida	28
2.9.1 Determinação do Pan e Core genoma dos isolados EAEC 041-2 e UPEC-34	28
2.9.2 Identificação de PAIs, profagos e plasmídeos dentro do genoma dos isolados selecionados	28
2.10 Construção de mutantes no isolado UPEC-34	29
2.11 Sequenciamento da amostra selvagem e mutante em <i>aggDCBA</i> e <i>afaABCDE</i>	31
2.12 Curva de crescimento bacteriano	32
2.13 Análise estatística	32
3 RESULTADOS	32
3.1 Teste de aglutinação com <i>Sacharomices boulardii</i>	32
3.2 Perfil de formação de biofilme abiótico entre os isolados O3:H2	33
3.3 Teste de adesão dos isolados EAEC do sorotipo O3:H2 em células T24	35
3.4 Padrão de autoagregação entre os isolados O3:H2	34
3.5 Perfil de resistência a antimicrobianos entre os isolados do sorotipo O3:H2	37
3.6 Sequenciamento Illumina entre os isolados O3:H2	38

3.7 Comparação genômica entre isolados representativos do sorotipo O3:H2 obtidos de amostras de urina e fezes.....	47
3.8 Presença do operon <i>afa</i> em isolados de EAEC do sorotipo O3:H2 obtidos de amostras de urina.....	48
3.9 Os plasmídeos dos isolados EAEC O3:H2 de fezes e urina apresentam similaridades genômicas.....	53
3.10 Mutação dos operons <i>aggDCBA</i> e <i>afaABCDE</i> no isolado UPEC-34.....	59
3.11 Curva de crescimento.....	62
3.12 A deleção de AAF/I causou redução na produção de biofilme de UPEC-34.....	63
3.13 Ensaios de autoagregação.....	64
3.14 Testes de adesão qualitativos em células T24.....	65
4 DISCUSSÃO.....	65
5 CONCLUSÕES.....	68
6 REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	81
Enterοaggregative <i>Escherichia coli</i> (EAEC) isolates obtained from non-diarrheic children carry virulence factor-encoding genes from Extraintestinal Pathogenic <i>E. coli</i> (ExPEC).....	82

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um microrganismo Gram-negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo um componente comensal da microbiota de humanos e animais, representando o anaeróbio facultativo de maior predominância no trato gastrointestinal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Embora classificada como comensal, a *E. coli* pode apresentar isolados patogênicos devido à sua plasticidade genômica. Essa característica refere-se a capacidade evolutiva de adquirir ou perder material genético por meio de processos da transferência horizontal de genes (HGT), como conjugação, transdução e transformação (AHMED *et al.*, 2008). Os genes incorporados nestes processos geralmente estão inseridos em elementos móveis como plasmídeos, transposons, bacteriófagos e ilhas genômicas. Dessa forma, alguns isolados de *E. coli* adquirem genes de virulência (GVs), o que lhes permite colonizar diferentes nichos no hospedeiro, sendo assim patógenos oportunistas. Como patógeno, *E. coli* é um dos agentes etiológicos mais comuns de diarreia, doença responsável pela mortalidade de milhares de crianças com menos de 5 anos ao redor do mundo, principalmente nas regiões da Ásia e África-Subsaariana (KOTLOFF *et al.*, 2013).

Os isolados de *E. coli* patogênicos são divididos entre os responsáveis por causar doenças intestinais, denominados *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e os isolados de *E. coli* capazes de causar infecções extra intestinais, que se inserem dentro do grupo das *E. coli* patogênicas extra intestinais (ExPEC). Os isolados de DEC são divididos em diferentes patotipos com base em seu conjunto de fatores de virulência (FVs); desse modo, entre os isolados de DEC estão os patotipos de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) e seu subgrupo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e a *E. coli* produtora de aderência difusa (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Já a definição dos patotipos de ExPEC é feita com base no sítio de infecção dentro do hospedeiro, tendo como alguns dos principais exemplos *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* causadora de meningite neonatal (MNEC) e *E. coli* causadora de sepse (SEPEC) (JOHNSON; RUSSO, 2005).

Além dos diferentes patotipos, os isolados de *E. coli* estão classificados em diferentes grupos filogenéticos, sendo oito classificados até o momento (A, B1, B2, C, D, E, F e G), sendo os mais predominantes A, B1, B2 e D (CLERMONT *et al.*, 2013; DENAMUR *et al.*, 2021).

Através das associações entre os antígenos O-polissacarídeo (sorogrupo), flagelar (H) e capsular (K) presentes na célula bacteriana, os isolados de *E. coli* são tipados em diferentes sorotipos, sendo mais usual a definição apenas pelo sorogrupo e antígeno flagelar (DENAMUR *et al.*, 2021).

E. coli enteroagregativa (EAEC) é um dos principais patótipos de DEC, estando associado a casos de diarreia aguda e persistente ao redor do mundo. Este nome se deve a sua adesão a células epiteliais HEp-2, encontrada a partir de isolados obtidos de casos de diarreia em crianças no Chile, em um padrão semelhante a “tijolos empilhados”, descrito como Padrão de aderência agregativa (AA) (NATARO *et al.*, 1987). Estudos posteriores demonstraram que isolados do patótipo EAEC produtores do padrão AA albergavam em comum plasmídeos de tamanho 55-65 megadaltons (MDa), apresentando regiões homólogas entre si (VIAL *et al.*, 1988). A identificação deste chamado plasmídeo de aderência agregativa (pAA) é associado a identificação de isolados como pertencentes ao patótipo EAEC, além da sua capacidade de albergar uma série de genes de virulência característicos desse patótipo (BAUDRY *et al.*, 1990; HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). A virulência em EAEC foi demonstrada através do isolado 042, de sorotipo O44:H18, que sendo testado voluntariamente em humanos, ocasionou diarreia na maioria dos indivíduos (NATARO *et al.*, 1995). Nos outros isolados desse estudo a diarreia não foi desencadeada entre os indivíduos testados, indicando que a colonização de EAEC no hospedeiro pode ser manifestada de maneira heterogênea entre o hospedeiro humano, alguns de maneira assintomática.

A patogênese de EAEC causando infecção em humanos geralmente passa pelos processos de adesão, formação de biofilme, secreção de toxinas e inflamação da mucosa intestinal (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012). O pAA alberga o regulador transcricional AggR, pertencente à família AraC, sendo responsável por regular a expressão gênica de diversos genes de virulência em pAA (CZECZULIN *et al.*, 1999). Também se insere em pAA o regulador negativo Aar (*AggR activated regulator*) que uma vez se ligando a AggR impede sua ligação a região promotora de outros genes (SANTIAGO *et al.*, 2016). Considerando a importância de AggR na patogênese de EAEC, os isolados deste patótipo estão classificados em típicos e atípicos com base na presença ou ausência do seu gene regulador *aggR* (KAPER *et al.*, 2004). Entre os mecanismos regulados por AggR estão as chamadas Fímbrias de aderência agregativa (AAFs), associadas a regulação do padrão AA típico em EAEC. A primeira AAF descrita, AAF/I, foi isolada a partir do isolado 17-2, de sorotipo O3:H2, estando atualmente descritas em cinco diferentes variantes (AAF/I-AAF/V)

(BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; BOISEN *et al.*, 2008; CZECHULIN *et al.*, 1997; JØNSSON *et al.*, 2015; SAVARINO *et al.*, 1994). As AAFs são codificadas por operons organizados de maneira similar através da via chaperona-usher, sendo constituídos pelos genes *aggA* e *aggB* que codificam as proteínas prioritária (pilina) e secundária da fímbria respectivamente, *aggC* que codifica o usher, e *aggD* que codifica a chaperona (JØNSSON *et al.*, 2017). O operon de AAF/II possui diferenças na sua codificação, estando inseridos em duas diferentes regiões do pAA, *operon-1*, codificando os genes *aafA* e *aafD* e *operon-2*, codificando os genes *aafB* e *aafC* (ELIAS *et al.*, 1999). A projeção das AAFs na colonização ao hospedeiro ocorre graças a ação da proteína chamada dispersina codificada pelo gene *aap*, que quando secretada na superfície de EAEC se liga ao LPS da membrana (SHEIKH *et al.*, 2002). O transporte da dispersina ocorre com o auxílio do sistema translocador Aat codificado pelos genes do operon *aatPABCD*, também codificados dentro de pAA (NISHI *et al.*, 2003).

Apesar da associação entre AAFs e o padrão AA estar bem caracterizada, outras adesinas foram associadas a presença deste padrão. No estudo de Lang *et al.* (2018), um conjunto de isolados de EHEC foi investigado, identificando um isolado de sorotipo O23:H8 contendo um plasmídeo positivo para o operon *aatPABCD* e *aap* de EAEC, porém ausente para os genes do operon codificador das variantes de AAFs.

Dentro deste plasmídeo foi identificada uma nova adesina denominada AFP (*aggregate-forming pilus*) e codificada pelo operon *afp*, que influenciou na autoagregação, citotoxicidade e adesão AA neste isolado (LANG *et al.*, 2018). AFP também foi identificada mediando o padrão AA em um isolado híbrido de UPEC/EAEC ausente para o regulador AggR (SCHÜROFF *et al.*, 2021). No trabalho de Petro *et al.* (2020) uma coleção de EAEC foi caracterizada, revelando um conjunto de isolados que não albergavam genes associados a nenhuma das AAFs, que entretanto albergavam um gene homólogo ao *cseA* (PETRO *et al.*, 2020). Este gene é responsável na codificação do fator de colonização CS22, uma estrutura fimbrial caracterizada e associada a adesão em isolados de ETEC (PICHEL; BINSZTEIN; VIBOUD, 2000). Os isolados *cseA*⁺ não apresentaram atividade de adesão a células HEp-2, entretanto foram capazes de se aderir a um modelo organóide de cólon, maneira equivalente ao isolado EAEC 042 indicando uma capacidade de adesão ao epitélio intestinal humano, entretanto necessitando de maiores estudos (BOISEN *et al.*, 2020; FREIRE *et al.*, 2022).

Uma das características de EAEC é a sua citotoxicidade à mucosa intestinal, destacando-se as toxinas plasmidiais Pet e EAST-1 e cromossômicas (Pic e ShET1). A toxina Pet (*plasmid-encoded toxin*) causa alterações no citoesqueleto celular pela clivagem da

foldrina epitelial (NAVARRO-GARCÍA *et al.*, 1999). A toxina EAST-1, codificada por *astA*, se liga aos receptores provocando um aumento do GMP cíclico em coelhos, apresentando atividade enterotoxigênica (SAVARINO *et al.*, 1993). A toxina Pic (*protein involved in colonization*) está relacionada a atividades como produção de muco, hemaglutinação e resistência ao soro (HENDERSON *et al.*, 1999). Já a toxina ShET1 (*Shigella-enterotoxin-1*) é responsável por induzir a secreção intestinal através das vias cAMP e cGMP; essa toxina é codificada pelos genes *setA* e *setB*, presentes na fita complementar de *pic* (FASANO *et al.*, 1997; HENDERSON *et al.*, 1999).

As infecções do trato urinário (ITUs) são um problema de saúde pública de frequente ocorrência, chegando a cerca de 150 milhões de casos/ano (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015). As ITUs são clinicamente divididas entre complicadas e não complicadas, sendo o primeiro grupo formado por infecções em indivíduos saudáveis, podendo se alojar em regiões do trato urinário inferior (cistites) e superior (pielonefrites) (FOXMAN, 2010; NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010). Já ITUs complicadas são aquelas que podem comprometer o trato urinário ou que estão associadas aos principais grupos de risco da doença, como mulheres grávidas, crianças, idosos entre outros. As mulheres estão em uma maior frequência de casos de ITUs, isto pode ser explicado pelo menor comprimento da uretra onde as bactérias iniciam a colonização com a região da bexiga, além da proximidade do canal vaginal com o reto (FOXMAN, 2010).

E. coli uropatogênica (UPEC) é o agente causador predominante de casos de infecções do trato urinário complicadas e não complicadas, chegando a ser responsável por mais de 80% dos casos (FLORES MIRELES *et al.*, 2015; FOXMAN, 2010). Sua colonização e invasão no trato urinário é possível graças a um conjunto de FVs como adesinas, toxinas e sistemas de captação de ferro (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015; KÖHLER & DOBRINDT, 2011).

A infecção de UPEC se inicia na uretra indo em direção à bexiga, onde os isolados conseguem se aderir a células uroteliais sendo mediados por suas principais adesinas, sendo estas a Fímbria do tipo 1 e Fímbria P, além das fimbrias F1C, S e Afa/Dr, sendo sintetizadas pela via chaperona-usher.

A Fímbria do tipo 1 (FT1) é uma das principais envolvidas na adesão e infecção de UPEC às células uroteliais, sendo constituída por um *cluster* de 9 genes (*fimA-fimH*). Em seu mecanismo de ação o gene *fimH* codifica a adesina FimH, localizada na superfície da estrutura fimbrial e é responsável pela ligação a proteínas manosiladas da superfície das

células uroteliais estimulando a liberação de Rho GTPases, causando remodelação da actina celular e facilitando a invasão bacteriana (KOGFELT *et al.*, 1990). Diversos estudos relataram existência de variabilidades alélicas no gene *fimH* associadas a mudanças na afinidade aos receptores manosilados e função proteica (PAUL *et al.*, 2013; QIN *et al.*, 2022). A classificação de *E. coli* com base nos subtipos alélicos de *fimH* possui relevância em cepas de importância clínica como ST131, frequentemente associadas a presença de *fimH30* e *fimH27* (JOHNSON *et al.*, 2013; ROER *et al.*, 2017). Uma vez realizada a invasão nas células uroteliais, alguns isolados de UPEC são capazes de formar Comunidades intracelulares bacterianas (CIBs) semelhantes a biofilmes, que servem como forma de escape do sistema imune, possibilitando a dispersão das bactérias e nova invasão celular (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015; ROSEN *et al.*, 2007).

A Fímbria P está associada principalmente a casos de pielonefrite, pela sua ligação às moléculas que compõem os glicolipídios presentes no rim (SVANBORG EDEN *et al.*, 1987). Seu *operon* é composto por 11 genes denominados *papA-papG* (*pyelonephritis associated pili*).

A Fímbria F1C não possui atividade de hemaglutinação e se adere aos receptores das células epiteliais da bexiga e do rim, induzindo a produção da citocina inflamatória IL-8 através de sua adesão às células uroepiteliais (BÄCKHED *et al.*, 2002; VAN DIE *et al.*, 1991).

A fímbria S possui estrutura genômica similar a fímbria F1C, possuindo diferenças em relação a afinidade dos seus receptores. Esta adesina recebe essa abreviação por sua ligação específica aos galactosídeos de ácido siálico (JOHNSON, 1991) e já foi detectada como um FV relevante na incidência de ITUs em modelos in vivo.

A família de adesinas Afa/Dr é constituída por operons de similar constituição genômica (*afa*, *dra*, *daa*) em uma organização geral de genes de A a E, sendo este último responsável pela codificação da adesina e o mais heterogêneo entre as variantes da família (SERVIN, 2005, 2014). As adesinas Afa/Dr são relacionadas em vários estudos à incidência de ITUs (ISHITOYA *et al.*, 2003; LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2005, 2006).

Os isolados de UPEC induzem a inflamação do uroepitélio através da secreção de toxinas e proteases, como exemplo a secreção de alfa-hemolisina, codificada pela proteína HlyA em alguns isolados de UPEC, com capacidade de formação de poros na membrana das células e lise, facilitando a bactéria em sua captação de nutrientes e ferro (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015; MOBLEY *et al.*, 1990). A toxina CNF-1 (Cytotoxic necrotizing factor

1) realiza rearranjos no citoesqueleto celular através da adesão ao receptor da célula hospedeira e introdução no citoplasma, induzindo a ativação de Rho GTPases e é capaz de escapar dos mecanismos de sistema imune ativando a via RAC-1 anti-apoptótica celular. A aquisição de ferro das células hospedeiras é um importante fator para UPEC realizado por sideróforos, nos quais podem se destacar a aerobactina e yersiniabactina (GARCIA; BRUMBAUGH; MOBLEY, 2011).

A colonização de UPEC e outros patótipos de ExPEC dentro do organismo estão relacionados a expressão de diferentes FVs que em conjunto facilitam a sua atividade nas células hospedeiras. Desta maneira, não há um consenso sobre qual gene ou conjunto de GVs poderia definir um isolado como extraintestinal. Em busca de avaliar um perfil intrínseco de virulência extraintestinal em *E. coli*, Picard e colaboradores (1999) desenvolveram um modelo de infecção em ratos, injetando de maneira subcutânea uma variedade de isolados de *E. coli* de diferentes origens comensais e patogênicas; deste modo a letalidade em ratos foi associada a um conjunto de genes de virulência como *pap*, *hly* e *sfa/foc*, associados principalmente a isolados do filogruppo B2. Posteriormente, Johnson e colaboradores (2000) expandiram o conceito de que na realidade, a virulência intrínseca em *E. coli* estaria associada proporcionalmente a quantidade de fatores de virulência independentemente de seu grupo filogenético. Com base nos genes de virulência detectados no banco de amostras investigadas no modelo de infecção e em suas caracterizações posteriores (JOHNSON *et al.*, 2001), este estabeleceu o critério para determinar a capacidade intrínseca de um isolado de *E.coli* em causar infecções extraintestinais, com base na presença de ao menos dois genes do conjunto *papA/papC*, *afa/dra*, *sfa/foc*, *kpsMTII*, e *iuc/iutA*, sendo classificado como ExPEC+ (JOHNSON *et al.*, 2003).

Isolados capazes de albergar genes de diferentes patótipos tanto dentro de DEC quanto de ExPEC, foram denominados recentemente como isolados heteropatogênicos/híbridos (SANTOS *et al.*, 2020). No mês de maio de 2011, foram notificados casos de pacientes em Hamburgo, na Alemanha, diagnosticados com a síndrome hemolítica urêmica (SHU), doença que normalmente gera quadros de diarreia sanguinolenta sendo associada à secreção da toxina Shiga (Stx) em isolados de STEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Em algumas semanas, os casos aumentaram exponencialmente em toda a Alemanha, afetando outras regiões da Europa e América do Norte sendo classificado como um surto. Através de análises microbiológicas, o isolado foi tipado como sendo pertencente ao sorotipo O104:H4, presente até então apenas em casos esporádicos de infecção (BAE *et al.*, 2006; MELLMANN *et al.*,

2008), além de pertencer ao patotipo STEC, por sua capacidade de secretar a toxina Shiga. Adicionado a estes resultados, foram detectadas em amostras deste surto genes característicos do patotipo EAEC, como *aggR*, *aggA*, *set1*, *pic* e *aap*, indicando uma combinação de diferentes fatores neste isolado do surto, o que ajuda a explicar sua alta virulência (BIELASZEWSKA *et al.*, 2011; SCHEUTZ *et al.*, 2011). Este foi considerado o maior surto relacionado a virulência de *E. coli* híbridas tendo duração total entre os meses de maio/2011 a julho/2011, gerando cerca de 4000 casos de 16 países, incluindo 908 casos de SHU e 54 mortes (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

A recente descoberta dos híbridos acendeu um alerta global devido ao seu potencial de causar maiores danos ao hospedeiro pela presença de diferentes combinações de GVs, e por sua circulação pelo mundo, como o surto iniciado pela Alemanha em 2011.

A presença do patotipo EAEC relacionada a híbridos é uma importante questão de saúde pelo potencial de circulação destes isolados albergando genes não pertencentes apenas a patotipos de DEC, como GVs relacionados a ExPEC.

O primeiro relato da potencial existência de híbridos EAEC/ExPEC ocorreu no ano de 1991, em Copenhague, na Dinamarca, o qual ocorreu um surto de infecções causadas por isolados de *E. coli* multirresistentes do sorotipo 078:H10, levando a 18 casos de ITUs e um caso de diarreia (OLESEN *et al.*, 1994). No período deste surto, o sorotipo O78:H10 havia sido uma novidade dentro dos casos epidemiológicos de EAEC; entretanto, com o maior acesso a outras técnicas genômicas e moleculares, *E. coli* pôde ser amplamente investigada quanto a sua presença de GVs. Análises moleculares realizadas posteriormente sobre estes isolados os apontaram como pertencentes ao filogrupa A e ST10. Foi também observado que os isolados do surto albergavam pelo menos um entre os genes *aggR*, *aataA* e *aaiC*, o que classifica estes como EAEC, além da presença de outros genes desse patotipo (*aggA*, *aap*, *ORF3*, *ORF61*, *pic*, *sat*, *astA*). Os isolados também albergavam genes associados a patogênese de ExPEC, como *fimH*, *fyuA*, *traT* e *iutA*, mas nenhum deles cumpriu os critérios moleculares para serem considerados como ExPEC+ segundo Johnson *et al.*, 2003 (OLESEN *et al.*, 2012).

No Brasil, o estudo realizado por Abe e colaboradores (2008) é considerado como um dos primeiros a relatar a presença de híbridos ExPEC/EAEC, no caso em uma coleção de 225 isolados obtidos de casos de ITUs da cidade de São Paulo no qual 16 apresentaram o padrão AA/ ou a presença do gene *aataA*, além da albergar tanto GVs associados a patogênese de

UPEC com *fim*, *aer*, *pap*, *hly*, *sfa* e *cnf*, como genes relacionados a EAEC, como os codificadores de AAF/I.

Estudos recentes vêm relatando a presença de isolados obtidos de infecções extra intestinais, como casos de ITUs e bacteremias contendo marcadores de virulência diagnósticos de EAEC, sendo estes denominados recentemente como híbridos ExPEC/EAEC (LARA *et al.*, 2017; MANDOMANDO *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2021; TANABE *et al.*, 2022; TOVAL *et al.*, 2014).

A presença de híbridos em isolados de UPEC também foi destacada em um estudo recente publicado em nosso grupo (TANABE *et al.*, 2022), o qual um conjunto de 110 isolados de obtidos de casos de ITUs foram caracterizados, levando a um conjunto de 4 isolados (3 de cistite e 1 de pielonefrite), pertencentes aos sorotipos O3:H2, O15:H16, O126:H10 e O90:H12, que albergavam marcadores típicos de EAEC, como *aggR* e *aatA*, sendo considerados como híbridos UPEC/EAEC.

A definição de um isolado como híbrido é complexa pela dificuldade de definição de um conjunto específico de genes que definam um isolado como extra intestinal. Desta maneira, os critérios estabelecidos por Johnson *et al.* (2003) foram utilizados como referência em alguns estudos. No trabalho de Nunes *et al.* (2017), um conjunto de isolados diagnosticados como EAEC obtidos de casos de indivíduos com e sem diarreia, foram classificados como híbridos ExPEC+ através desses critérios (NUNES *et al.*, 2017).

Em um estudo recente do nosso laboratório, um conjunto de isolados de EAEC obtidos da microbiota de crianças sem diarreia foi investigado em relação a seus genes de virulência, demonstrando que cerca de 40,5% destes preencheram aos critérios propostos por Johnson e colaboradores (2003), sendo considerados híbridos ExPEC/EAEC (LUIZ *et al.*, 2024).

6 REFERÊNCIAS

- ABE, C. M. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 397–406, abr. 2008.
- AHMED, N. *et al.* Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n.5, p. 387- 394, maio 2008.
- ALIKHAN, N.F. *et al.* BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 402, 8 dez. 2011.
- ANDERSON GG *et al.* Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. **Science**. v. 301, n. 5629, p. 105-107, jul. 2003.
- ARTHUR, M. *et al.* Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 2, p. 303–313, fev. 1989.
- AVELINO, F. *et al.* The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells, **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 7, p. 440-448, nov. 2010.
- BÄCKHED, F. *et al.* Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 18198–18205, maio 2002.
- BAE, W. K. *et al.* A Case of Hemolytic Uremic Syndrome Caused by *Escherichia coli* O104:H4. **Yonsei Medical Journal**, v. 47, n. 3, p. 437-439, jun 2006.
- BANJO, M. *et al.* *Escherichia coli* H-Genotyping PCR: a Complete and Practical Platform for Molecular H Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 6, p. e00190-18 jun. 2018.
- BANKEVICH, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.
- BAUDRY, B. *et al.* A Sensitive and Specific DNA Probe to Identify Enteroaggregative *Escherichia coli*, a Recently Discovered Diarrheal Pathogen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 6, p. 1249–1251, 1 jun. 1990.
- BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, abr. 1966.

BEATSON, S. A. *et al.* Molecular analysis of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain VR50 reveals adaptation to the urinary tract by gene acquisition. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1749–1764, maio 2015.

BEGHAIN, J. *et al.* ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 7, 1 jul. 2018.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-Encoding operon family. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4302–4311, ago. 2002.

BERTELLI, C. *et al.* IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W30–W35, jul. 2017.

BHARGAVA, S. *et al.* Heat-resistant agglutinin 1 is an accessory enteroaggregative *Escherichia coli* Colonization Factor. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 15, p. 4934–4942, ago. 2009.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671–676, set. 2011.

BOISEN, N. *et al.* New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF Family. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3281–3292, jul. 2008.

BOISEN, N. *et al.* Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): Genomic characterization of epidemiological EAEC strains. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008613, set. 2020.

BORTOLAIA, V. *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3491–3500, dez. 2020.

CAMACHO, C. *et al.* BLAST+: Architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n421, dez. 2009.

CARATTOLI, A. *et al.* In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, jul. 2014.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Infections Associated With Sprout Consumption - Europe and North America, May-July 2011. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/>>.

CHAUVEROCHE, M.-K. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 22, p. 97e–997, 15 nov. 2000.

CHEN, S. *et al.* fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884–i890, set. 2018.

CLERMONT, O. *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, fev. 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **CLSI M100**: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 35rd ed (2025).

CZECZULIN, J. R. *et al.* Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v.65, n.10, p. 4135-4145, out. 1997.

CRAVIOTO, A *et al.* An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**, v. 3, p. 95–99, 1979.

CZECZULIN, J. R. *et al.* Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 2692–2699, jun. 1999.

DATSENKO, K.A., WANNER B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v.97, n.12, p. 6640-6645, jun. 2000.

DENAMUR, E. *et al.* The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37–54, jan. 2021.

DIAS, R. C. B. *et al.* Analysis of the virulence profile and phenotypic features of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated from diarrheal patients in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n.144, abr. 2020.

ELIAS, W. P. *et al.* Distribution of *aggA* and *aafA* gene sequences among *Escherichia coli* isolates with genotypic or phenotypic characteristics, or both, of enteroaggregative *E. coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 597–599, jun. 1999.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 281–298, dez. 2012.

EWELS, P. *et al.* MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047–3048, out. 2016.

FASANO, A. *et al.* Effect of shigella enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine in vitro and in vivo. **Gut**, v. 40, n. 4, p. 505–511, abr. 1997.

FLORES-MIRELES, A. L. *et al.* Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, maio 2015.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, v.7, p.653-667, dez. 2010.

GARCIA, E. C.; BRUMBAUGH, A. R.; MOBLEY, H. L. T. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1225–1235, mar. 2011.

GERMANI, Y. *et al.* Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregative., and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in new caledonia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 174, n. 5, p. 1124–1126, nov. 1996.

GOMES, T. A. T. *et al.* Adherence Patterns and Adherence-Related DNA Sequences in *Escherichia coli* Isolates from Children with and without Diarrhea in São Paulo City, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3609–3613, dez. 1998.

GORIS, J. *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 81-91, jan. 2007.

GREENE, S. E. *et al.* Human urine decreases function and expression of type 1 pili in uropathogenic *Escherichia coli*. **mBio**, v. 6, n. 4, jun. 2015.

GRIFFIN, P. M.; MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, p. 712–719, set. 2012.

HANCOCK V, WITSØ IL, KLEMM P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n.7, p. 570-576, nov.2011.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 12–18, jan. 2006.

HEBBELSTRUP JENSEN, B. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* in daycare—A 1-Year dynamic cohort study. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.27,n.6, jul. 2016.

HEBBELSTRUP JENSEN, B. *et al.* Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 614–630, 2014.

HENDERSON, I. R. *et al.* Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5587–5596, nov. 1999.

HERNANDES RT. *et al.* Comparative genomic analysis provides insight into the phylogeny and virulence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.14, n. 6, jun. 2020.

HERNANDES R.T. *et al.* 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. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3793-3802, out. 2013.

HERNANDES R.T. *et al.* Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.23, p.8391-8399, dez. 2011.

HSIAO W *et al.* IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes. **Bioinformatics**, v.19, n.3, p. 418-420, fev. 2003.

IGUSHI, A. *et al.* *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.53, n. 8, p. 2427-2432, jul. 2015.

ISHITOYA, S. *et al.* Distribution of *afaE* adhesins in *Escherichia coli* isolated from Japanese patients with urinary tract infection. **Journal of Urology**, v. 169, n. 5, p. 1758–1761, maio 2003.

JOENSEN, K. G. *et al.* Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1501–1510, maio 2014.

JOENSEN, K. G. *et al.* Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2410–2426, ago. 2015.

JOHNSON J.R *et al.* Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n.6, p.919-928, mar. 2013.

JOHNSON J. R, Kuskowski M. Clonal origin, virulence factors, and virulence. **Infection and Immunity** v. 68, n.1, p. 424–425, jan 2000.

JOHNSON, J. R. Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. **Clinical microbiology reviews**, v.4, n.1, p.80-128, jan 1991.

JOHNSON, J. R. *et al.* Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, V. 83, n. 1, p. 78-88, jun. 2001.

JOHNSON, J. R. *et al.* Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2161–2168, jul. 2003.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 383–404, out. 2005.

JØNSSON, R. *et al.* Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1396–1405, abr. 2015.

JØNSSON, R. *et al.* Structural and functional studies of *Escherichia coli* aggregative adherence fimbriae (AAF/V) reveal a deficiency in extracellular matrix binding. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 3, p. 304–311, mar. 2017.

KAAS, R. S. *et al.* Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, e104984, ago. 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0104984. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>. Acesso em mar, 2025.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.

KJÆRGAARD, K. *et al.* Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 695–702, dez. 2000a.

KJÆRGAARD, K.; SCHEMBRI, M. A.; HASMAN, H. Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter-and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4789–4796, set. 2000b.

KÖHLER, C.-D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 642–647, dez. 2011.

KOT, B. Antibiotic Resistance among Uropathogenic *Escherichia coli*. **Polish Journal of Microbiology**, v.68, n.4, p.403–415, jan 2019

KOTLOFF, K. L. *et al.* 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 (London, England)**, v. 382, n. 9888, p. 209–22, jul. 2013.

KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 6, p. 1995–1998, jun. 1990.

LABIGNE-ROUSSEL, A. F. *et al.* Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a

pyelonephritic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 1, p. 251–259, out. 1984.

LANG, C. *et al.* Novel type of pilus associated with a Shiga-toxigenic *E. coli* hybrid pathovar conveys aggregative adherence and bacterial virulence. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–16, dez. 2018.

LANGILLE, M.G., HSIAO, W.W. & BRINKMAN, F.S. Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. **BMC Bioinformatics** v.9, n. 329, ago. 2008

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, abr. 2012.

LARA, F. B. M. *et al.* Virulence Markers and Phylogenetic Analysis of *Escherichia coli* Strains with Hybrid EAEC/UPEC Genotypes Recovered from Sporadic Cases of Extraintestinal Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n.146, fev. 2017. DOI 10.3389/fmicb.2017.00146. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00146>. Acesso em mar, 2023.

LARSEN, M. V. *et al.* Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355–1361, abr. 2012.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE', A. Rapid and Specific Detection of the pap, afa, and sfa Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains by Polymerase Chain Reaction. **Journal of clinical microbiology**, v.30, n.5, p. 1189-1193, maio 1992.

LE BOUGUÉNEC, C. *et al.* Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of *afa* adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1738–1745, maio 2001.

LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, n. 2, p. 185-194, mar. 2006.

LIMA, F.M. *et al.* Epidemiology and genetic screening of diarrheagenic *Escherichia coli* among symptomatic and asymptomatic children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 1033-1041, jul 2019.

LUIZ, B. M. *et al.* Enteraggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolates obtained from non-diarrheic children carry virulence factor-encoding genes from Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.55, n.4, p. 3551-3561, dez 2024.

MANDOMANDO, I. *et al.* *Escherichia coli* ST131 clones harbouring AggR and AAF/V fimbriae causing bacteremia in Mozambican children: Emergence of new variant of *fimH27* subclone. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1–21, maio 2020.

MALBERG TETZSCHNER, A.M. *et al.* In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. **Journal of Clinical Microbiology**, v.58, n. 10, e01269-20, set. 2020.

MELLMANN, A. *et al.* Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1287–1290, ago. 2008.

MOBLEY, H. L. *et al.* Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 5, p. 1281–1289, maio 1990.

NASCIMENTO, J. A. S. *et al.* Frequency and diversity of hybrid *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 693, abr 2021.

NATARO, J. P. *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829–831, set. 1987.

NATARO, J. P. *et al.* Heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Demonstrated. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 2, p. 465–468, 1 fev. 1995.

NAVARRO-GARCIA F., ELIAS WP. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**. v. 2, n. 1, p. 13-24, jan. 2011.

NAVARRO-GARCÍA, F. *et al.* Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2184–2192, maio 1999.

NIELUBOWICZ, G. R.; MOBLEY, H. L. T. Host–pathogen interactions in urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, v. 7, n. 8, p. 430–441, ago. 2010.

NISHI, J. *et al.* The Export of Coat Protein from Enteroaggregative *Escherichia coli* by a Specific ATP-binding Cassette Transporter System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45680–45689, nov. 2003.

NOWICKI, B.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, S. Family of *Escherichia coli* Dr Adhesins: Decay-Accelerating Factor Receptor Recognition and Invasiveness. **The Journal of infectious Diseases**, v. 183, p. S24-S27, mar, 2001.

NUNES, K. O. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 8, nov. 2017.

OLESEN, B. *et al.* Cluster of Multiresistant *Escherichia coli* O78:H10 in Greater Copenhagen. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 406–410, jan. 1994.

OLESEN, B. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* O78:H10, the Cause of an Outbreak of Urinary Tract Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3703–3711, nov. 2012.

OTEO, J. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 2, p. 173, ago. 2009.

PAGE, A. J. *et al.* Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. **Bioinformatics**, v. 31, n. 22, p. 3691–3693, nov. 2015.

PAUL, S. *et al.* Role of homologous recombination in adaptive diversification of extraintestinal *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 231–42, jan. 2013.

PETRO, C. D. *et al.* Genetic and Virulence Profiles of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EAEC) Isolated From Deployed Military Personnel (DMP) With Travelers' Diarrhea. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, maio 2020.

PICARD *et al.* The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 546–553, fev 1999.

PICHEL, M.; BINSZTEIN, N.; VIBOUD, G. CS22, a Novel Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Adhesin, Is Related to CS15. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3280–3285, jun. 2000.

PICHON, C. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* AL511 requires flagellum to enter renal collecting duct cells. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 616–628, 2009.

PRITCHARD, L. *et al.* Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 12–24, 2016.

PROROK-HAMON, M. *et al.* Colonic mucosa-associated diffusely adherent *afaC*⁺ *Escherichia coli* expressing *lpfA* and *pks* are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 761–770, maio 2014.

ROER *et al.*, Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on *fimH* Alleles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2538–2543, jun. 2017.

QIN, J. *et al.* Conserved FimH mutations in the global *Escherichia coli* ST131 multi-drug resistant lineage weaken interdomain interactions and alter adhesin function. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 4532–4541, ago. 2022.

ROSEN, D. A. *et al.* Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, p. e329, dez. 2007.

SALDAÑA, Z. *et al.* The *Escherichia coli* Common Pilus and the Bundle-Forming Pilus Act in Concert during the Formation of Localized Adherence by Enteropathogenic *E. coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n.11, p. 3451-3461, jun 2009.

SAMPAIO, S. C. F. *et al.* 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. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4406–4413, out. 2009.

SANTIAGO, A. E. *et al.* A large family of anti-activators accompanying XylS/AraC family regulatory proteins. **Molecular Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 314–332, jul. 2016.

SANTOS, A. C. M. *et al.* Diversity of Hybrid-and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 339, jul. 2020.

SAVARINO, S. J. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 7, p. 3093–3097, abr. 1993.

SAVARINO, S. J. *et al.* Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 16, p. 4949–4957, ago. 1994.

SCHEUTZ, F. *et al.* Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/ verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome. **Eurosurveillance** v.16, n. 24, jun. 2011.

SCHILLER *et al.* The Superior Adherence Phenotype of *E. coli* O104:H4 is Directly Mediated by the Aggregative Adherence Fimbriae Type I. **Virulence**, v.12, n.1, p.346-359, jan. 2021.

SCHMIDT, H. *et al.* Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 701–705, mar. 1995.

SCHÜROFF, P. A. *et al.* The aggregate-forming pili (AFP) mediates the aggregative adherence of a hybrid-pathogenic *Escherichia coli* (UPEC/EAEC) isolated from a urinary tract infection. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 3073–3093, 2021.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n. 2, p. 264-292, abr. 2005.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 823–869, out. 2014.

SHAH, C. *et al.* Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, set. 2019.

SHEIKH, J. *et al.* A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 9, p. 1329–1337, nov. 2002.

SHEIKH, J. *et al.* Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 687–690, nov. 2004.

SORIA-BUSTOS, J. *et al.* Role of the YehD fimbriae in the virulence-associated properties of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology**, v.23, n. 3, p. 1035-1051, março 2022.

SULLIVAN M.J., PETTY N.K., BEATSON S.A. Easyfig: a genome comparison visualizer. **Bioinformatics**. V. 27, n.7, p. 1009-1010, abr. 2011.

SVANBORG EDEN, C. *et al.* Glycoconjugate receptors for bacteria attaching to mucosal sites: examples for *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 216B, p. 931-939, 1987.

TANABE, R. H. S. *et al.* Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals Hybrid Isolates of Uropathogenic and Diarrheagenic (UPEC/DEC) *E. coli*. **Microorganisms**, v. 10, n. 645, mar. 2022.

TOVAL, F. *et al.* Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Hospital Inpatients or Outpatients with Urinary Tract Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 407–418, fev. 2014.

VAN DIE, I. *et al.* Nucleotide sequence of the genes coding for minor fimbrial subunits of the F1C fimbriae of *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 142, n. 6, p. 653–658, 1991.

VIAL, P. A. *et al.* Characterization of Enteroadherent-Aggregative *Escherichia coli*, a Putative Agent of Diarrheal Disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 158, n. 1, p. 70–79, jul. 1988.

WAACK, S., KELLER, O., ASPER, R. *et al.* Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. **BMC Bioinformatics** v.7, n.142, mar. 2006.

WICK, R. R. *et al.* Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. e1005595, jun. 2017.

WIRTH, T. *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1136–1151, jun. 2006.

WISHART, D. S. *et al.* PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. W1, p. W443–W450, jul. 2023.

YAMAMOTO, S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Infection and Chemotherapy** Springer Japan, v. 13, . 2, p.68-73, abr. 2007.