

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ANÁLISE DO PERFIL DE VIRULÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA
MOLECULAR DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA
(EAEC) ISOLADAS DE CASOS ESPORÁDICOS DE DIARREIA
NO BRASIL: UM ESTUDO RETROSPECTIVO DE 2010 A 2016

REGIANE CHRYSOSTOMO BITENCORT DIAS

Orientador: RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

Coorientador: LUIS FERNANDO DOS SANTOS

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.

Profº Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dias, Regiane Chrysostomo Bitencort.

Análise do perfil de virulência e epidemiologia molecular de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) isoladas de casos esporádicos de diarreia no Brasil : um estudo retrospectivo de 2010 a 2016 / Regiane Chrysostomo Bitencort Dias. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez
Coorientador: Luis Fernando dos Santos
Capes: 21202010

1. *Escherichia coli*. 2. Diarreia - Diagnóstico.
3. Vigilância epidemiológica. 4. Fatores de virulência.

Palavras-chave: Diagnóstico; Diarreia; EAEC; *Escherichia coli* enteroagregativa; Fatores de virulência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada (área de concentração: Biologia de Parasitas e Microrganismos), no Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando,
no fim terás o que colher”*

Cora Coralina

Dedico esse trabalho aos meus pais, Manoel e Natalina, e meu esposo Lauro, por todo amor, apoio, incentivo e dedicação incondicional que me deram desde o início.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de ter feito o doutorado e ter conseguido concluir mais essa etapa na minha vida. Por ter me guiado e iluminado durante todo esse período.

Agradeço aos meus pais, Natalina e Manoel, por terem me apoiado e incentivado em todas as etapas da minha vida. Obrigada pelas palavras de apoio e pelas orações nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu esposo, Lauro, pelo incentivo, apoio e compreensão. Obrigada por sempre respeitar minhas decisões e permanecer ao meu lado, fazendo todo o possível para me ajudar.

À minha prima/irmã Luciene, meu primo Gilberto, meu afilhado Caio e meus tios Clarice e José, pelo incentivo, apoio e carinho. Obrigada por fazerem parte da minha vida, mesmo à distância.

Aos meus sogros, Maria e Zé Luiz, que sempre me compreenderam e apoiaram, fazendo o possível para me ajudar. Agradeço também às minhas tias do coração, Keka e Tóti, pelo apoio e incentivo nessa caminhada.

À todos os meus familiares e amigos, que direta ou indiretamente me apoiaram, motivaram e incentivaram, agradeço de todo meu coração. Muito Obrigada.

Agradeço ao meu orientador, Profº Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez, pela oportunidade de ter realizado o doutorado em seu laboratório. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e por ter me orientado em todos os momentos do doutorado. Muito Obrigada.

Ao Pesquisador Científico, Luis Fernando dos Santos, do Instituto Adolfo Lutz, por ter aceitado ser meu coorientador, e pela colaboração durante a pesquisa.

Ao Profº Dr. Waldir P. Elias e à Profª Dra. Tânia A. T. Gomes, pelos ensinamentos, apoio e colaboração durante a realização dessa pesquisa.

Aos meus companheiros de laboratório, Melissa A. Vieira e Rodrigo H. Tanabe. Obrigada pela ajuda e apoio durante o doutorado.

Aos meus companheiros de departamento, Stéfani Dantas e Henrique Orsi, pelo companheirismo e apoio.

À Profª Dra. Terue Sadatsune, pelo carinho, atenção e ajuda, em todos os momentos dessa pesquisa.

À Profª Dra. Vera Lúcia M. Rall, pelo carinho, por ser sempre tão atenciosa e sempre estar disposta a ajudar.

Ao Profº Dr. Maucício Sforcin, pela amizade, carinho e atenção que sempre teve comigo.

À todos os Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB/Unesp de Botucatu, por serem sempre tão atenciosos e pelo apoio e incentivo durante todo o doutorado.

Aos Técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB/Unesp de Botucatu, Aline, Ivana, Larissa, Luís e Rafael. Obrigada pelo apoio e por serem sempre tão prestativos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do Programa de Biologia Geral e Aplicada, principalmente ao David Müller. Muito obrigada.

Ao Instituto Adolfo Lutz, por ceder os isolados e dados dos pacientes, e aos funcionários do Núcleo de Coleção de Microrganismos: Tânia, Vanessa, Malu, Lígia, Maria e Elizabeth, pelos ensinamentos e ajuda durante o período de preparo e depósito dos isolados.

À Cefar, pela doação dos discos de antibióticos utilizados nessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudo oferecida durante a realização do meu doutorado.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	8
Objetivos específicos.....	8
MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
Isolados de EAEC.....	9
Determinação do antígeno somático (O) e do antígeno flagelar (H).....	9
Identificação de marcadores de virulência	10
Identificação do Grupo Filogenético	10
Teste de sensibilidade antimicrobiana.....	11
Teste de adesão em células epiteliais HeLa.....	16
Análise estatística	17
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	45
APÊNDICE B - COAUTORIA EM ARTIGO PUBLICADO	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores de virulência utilizados para a pesquisa de isolados de EAEC típica e atípica	12
Tabela 2. Identificação dos primers utilizados para a identificação do grupo filogenético entre os isolados de EAEC	16
Tabela 3. Dados demográficos relacionados à origem dos isolados de EAEC obtidos no Brasil durante o período de 2010-2016.....	18
Tabela 4. Identificação dos sorotipos dos isolados de EAEC típica e atípica.	20
Tabela 5. Detecção do grupo filogenético entre os isolados de EAEC típicas (<i>aatA</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁺) e atípicas (<i>aatA</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁻) deste estudo.	22
Tabela 6. Frequência dos genes que codificam fatores de virulência em isolados de EAEC típica e atípica deste estudo	24
Tabela 7. Correlação dos genes que codificam o operon <i>aai</i> entre os isolados de EAEC típica e EAEC atípica	25
Tabela 8. Correlação de genes codificadores de adesinas e padrões de aderência detectados em isolados EAEC típica e atípica	26
Tabela 9. Características moleculares e fenotípicas dos isolados de EAEC atípicos que albergam genes do operon <i>afp</i>	27
Tabela 10. Susceptibilidade aos antimicrobianos entre os isolados de EAEC deste estudo.	30
Tabela 11. Combinações de resistência aos antimicrobianos dos isolados de EAEC deste estudo.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padrão de aderência agregativa (AA) de um isolado de EAEC em células HEp-2 cultivadas <i>in vitro</i> e na superfície da lâmina de vidro.	1
Figura 2. Frequência dos isolados de EAEC típica (<i>aatA</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁺) e atípica (<i>aatA</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁻) obtidos de pacientes com diarreia no Brasil.	19
Figura 3. Microscopia óptica ilustrando os principais padrões de aderência observados em isolados de EAEC deste estudo.	28
Figura 4. Microscopia óptica ilustrando o padrão de aderência AA no isolado de EAEC atípica <i>afp</i> ⁺ (IAL6006).	29

RESUMO

A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é um importante agente causador de diarreia aguda e persistente em crianças e adultos em todo o mundo. EAEC é definida como isolados de *E. coli* que produzem o padrão de aderência agregativa (AA) em células epiteliais (HeLa e/ou HEP-2) cultivadas *in vitro*. O patotipo EAEC pode ser dividido em típico e atípico com base na presença do gene *aggR*, que codifica um ativador transcricional, presente apenas no primeiro grupo. O objetivo deste estudo foi caracterizar uma coleção de isolados de EAEC obtidos de pacientes com diarreia durante um período de 7 anos de vigilância epidemiológica (2010-2016). Um total de 220 isolados de EAEC (194 típicas e 26 atípicas) foi classificado nos distintos grupos filogenéticos de *E. coli*, e caracterizados quanto aos sorotipos (O:H), padrão de aderência produzidos em células HeLa, sensibilidade aos antimicrobianos, e a presença de 25 genes responsáveis por codificarem fatores de virulência no patotipo EAEC. A maioria dos isolados de EAEC foi classificada nos grupos filogenéticos A (44,1%; 97/220) e B1 (21,4%; 47/220). Em relação ao padrão de aderência, observamos que 92,7% (204/220) produziram o padrão AA. Além disso, foram identificados nove isolados (4,1%; 9/220) que produziram a aderência em cadeia (CLA), dos quais seis produziram concomitantemente o padrão AA, além de isolados de EAEC que produzem um padrão de aderência indefinido (1,4%; 3/220) e isolados não aderentes (3,6%; 8/220). Foi identificado somente 0,9% (2/220) de multirresistência entre os isolados de EAEC. Os genes responsáveis por codificar a subunidade principal das cinco fimbrias de adesão agregativa (AAF) foram detectados em 55,7% (108/194) dos isolados de EAEC típica estudados, sendo os genes *agg4A* e *agg5A* os mais prevalentes, e igualmente detectados em 16,5% (32/194). Entre os 25 genes que codificam fatores de virulência investigados, *aap* (95,5%; 210/220), *aar* (81,8%; 180/220), *orf3* (89,5%; 197/220) e *pic* (57,7%; 127/220) foram os mais frequentes, enquanto doze genes (*agg4A*, *agg5A*, *pic*, *aaiA*, *aaiC*, *aaiG*, *aap*, *orf3*, *aar*, *air*, *capU* e *shf*) foram estatisticamente associados ao subgrupo das EAEC típicas ($P < 0,05$). Os genes *afpB*, *afpD*, *afpP* e *afpA2*, localizados no operon *afp* (*aggregate-forming pili*), bem como seu regulador *afpR*, foram detectados em 57,7% (15/26) dos isolados de EAEC atípica, mostrando uma associação significativa com esse subgrupo de EAEC ($P < 0,001$). Em conclusão, nosso estudo demonstrou que apesar da heterogeneidade encontrada entre os isolados de EAEC estudados, os genes localizados no operon *afp* foram estatisticamente associados aos isolados de EAEC atípica, apontando esse conjunto de genes como possíveis novos marcadores de diagnóstico para aumentar a eficiência na identificação desse subgrupo de EAEC.

Palavras-chaves: EAEC, *Escherichia coli* enteroagregativa, aderência agregativa, diarreia, adesinas, fatores de virulência, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an important agent that causes acute and persistent diarrhea in children and adults worldwide. EAEC is defined as *E. coli* isolates that produce the aggregative adherence pattern (AA) on epithelial cells (HeLa and/or HEp-2) cultured *in vitro*. The EAEC pathotype can be divided in typical and atypical based on the presence of the *aggR* gene, which encodes a transcriptional activator, in the former group. The aim of this study was to characterize a collection of EAEC isolates obtained from diarrheal patients over a 7-year period of surveillance (2010-2016). A total of 220 EAEC isolates (194 typical and 26 atypical) were evaluated regarding the phylogenetic classification, serotypes, adherence pattern produced on HeLa cells, susceptibility to antimicrobial drugs and the presence of 25 virulence factor-encoding genes. The majority of the EAEC isolates were assigned to phylogroups A (44.1%; 97/220) and B1 (21.4%; 47/220). Regarding the adherence pattern, was observed that 92.7% (204/220) produced AA. Moreover, we identified nine isolates (4.1%; 9/220) that produced the chain-like adherence (CLA), with six of them producing concomitantly the AA pattern, besides EAEC isolates producing an undefined adherence (1.4%; 3/220) and isolates non-adherent (3.6%; 8/220). Only 0.9% (2/220) of the EAEC isolates studied presented the multidrug resistance phenotype. The genes encoding for the major pilin subunit of all five previously described aggregative adherence fimbriae (AAF) were detected among the EAEC isolates studied (55.7%; 108/194), with *agg4A* and *agg5A* being the most frequent, and equally detected in 16.5% (32/194) of the typical EAEC isolates. Among the 25 virulence factor-encoding genes investigated here, *aap* (95.5%; 210/220), *aar* (81.8%; 180/220), *orf3* (89.5%; 197/220), and *pic* (57.7%; 127/220) were the most prevalent, while twelve genes (*agg4A*, *agg5A*, *pic*, *aap*, *aaiA*, *aaiC*, *aaiG*, *orf3*, *aar*, *air*, *capU* and *shf*) were statistically more frequent in typical than atypical EAEC ($P<0.05$). The *afpB*, *afpD*, *afpP* and *afpA2* genes, present in the *afp* operon, and its *afpR* regulator, were detected in 57.7% (15/26) of the atypical EAEC isolates, showing a statistically significant association with this EAEC subgroup ($P<0.001$). In conclusion, our study demonstrated that despite the heterogeneity found among the EAEC isolates studied, the genes from the *afp* operon were statistically associated with the atypical EAEC isolates, pointing this set of genes as a putative new diagnostic marker to be use, in order to increase the efficiency in the identification of this EAEC subgroup.

Keywords: EAEC, enteroaggregative *Escherichia coli*, aggregative adherence, diarrhea, adhesins, virulence factors, antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli que causam a doença diarreica são definidas como *E. coli* diarreiogênica (ECD) e se dividem em seis patotipos distintos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* que aderem difusamente (DAEC). Esses patotipos diferem-se, principalmente, pela presença de fatores de virulência, pelas síndromes clínicas características que promovem e pelo fenótipo que apresentam em testes de aderência com células epiteliais (HeLa ou Hep-2) cultivadas *in vitro* (NATARO, KAPER, 1998; KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

A definição de EAEC mais difundida, até o momento, se baseia na determinação do padrão de aderência agregativo (AA) em testes realizados com células HeLa ou Hep-2 cultivadas *in vitro*, onde as bactérias se unem umas às outras, assemelhando-se a uma parede de tijolos empilhados e aderem tanto às células epiteliais quanto à superfícies abióticas, tais como as lamínulas de vidro ou poliestireno (Figura 1). Este padrão de aderência foi descrito pela primeira vez durante a avaliação da interação de isolados de *E. coli*, obtidas de crianças com diarreia no Chile, com células epiteliais *in vitro* (NATARO *et al.*, 1987). Uma vez que a identificação do padrão de aderência do patotipo EAEC é realizada principalmente por laboratórios de pesquisa e laboratórios de referência (JENSEN *et al.*, 2014), estudos tem identificado marcadores moleculares que possam ajudar na investigação de isolados desse patotipo (BAUDRY *et al.*, 1990; CERNA, NATARO, ESTRADA-GARCIA, 2003; KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004; DUDLEY *et al.*, 2006a, ANDRADE, GOMES, ELIAS, 2014).

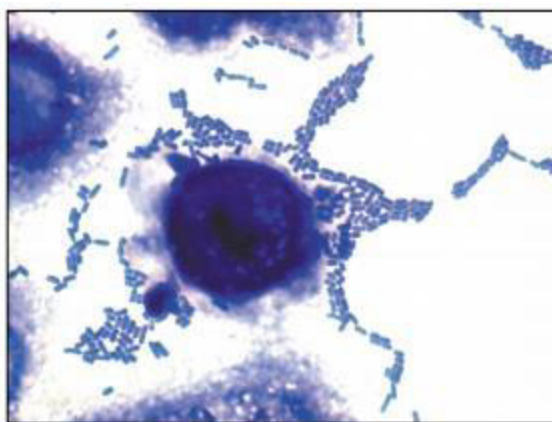


Figura 1. Padrão de aderência agregativa (AA) de um isolado de EAEC em células Hep-2 cultivadas *in vitro* e na superfície da lâmina de vidro. Extraído de Okeke & Nataro, 2001.

O patotipo EAEC tem sido identificado como um agente etiológico da doença diarreica que acomete crianças e adultos em países em desenvolvimento (NATARO *et al.*, 2006), incluindo indivíduos com o sistema imune debilitado e também como causa de diarreia dos “viajantes”, em áreas consideradas endêmicas (HUANG *et al.*, 2006). Nos países em desenvolvimento, EAEC tem sido associada à diarreia persistente, ou seja, quando a duração do quadro diarreico é igual ou superior a 14 dias (CRAVIOTO *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 1992; FANG *et al.*, 1995). No Brasil, um estudo recente, identificou frequência similar de EAEC em fezes de crianças saudáveis e com diarreia, reforçando a dificuldade na identificação de organismos verdadeiramente patogênicos dentro desse patotipo (DIAS *et al.*, 2016), como previamente identificado em outros estudos (GIOPPPO *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2019).

A diarreia é considerada uma doença autolimitada e com a terapia de reidratação oral seu curso se resolve sem grandes complicações, entretanto, em casos de infecção persistente ou diarreia do viajante se faz necessário o uso de antimicrobianos. A ampla caracterização de isolados de EAEC quanto ao fenótipo de resistência aos antimicrobianos demonstra que existe diferenças no perfil de resistência de acordo com a região geográfica de origem destes isolados (CROXEN *et al.*, 2013; JENSEN *et al.*, 2014). Em estudos realizados no Reino Unido (DALLMAN *et al.*, 2014), Gambia (IKUMAPAYI *et al.*, 2017), Bangladesh (CHATTAWAY *et al.*, 2017) e Dinamarca (JENSEN *et al.*, 2018) foram observadas taxas mais altas de resistência à ciprofloxacina quando comparado com estudos realizados no Brasil (DIAS *et al.*, 2016) e no Irã (ASLANI *et al.*, 2011). Altas taxas de resistência à ampicilina e trimetoprim-sulfametoxazol já foram observados em estudos realizados no Irã (ASLANI *et al.*, 2011) e em Gambia (IKUMAPAYI *et al.*, 2017), e se mostram similares aos observados em estudos realizados no Brasil (DIAS *et al.*, 2016; TABORDA *et al.*, 2018). A frequência de isolados de EAEC apresentando o fenótipo de multirresistência tem sido observada em muitos estudos, entretanto, esse fenótipo tem sido observado mais frequentemente em estudos realizados no Paquistão (KHALIL *et al.*, 2016), Bangladesh (CHATTAWAY *et al.*, 2017) e Dinamarca (JENSEN *et al.*, 2018).

Um estudo realizado por Clermont *et al.* (2013) relacionou os grupos filogenéticos A, B1 e E com isolados de *E. coli* diarreiogênica, enquanto os grupos filogenéticos B2, D e F estariam relacionados aos isolados de ExPEC (CLERMONT *et al.*, 2013). Recentemente foi descrito um novo grupo filogenético, denominado grupo filogenético G, o qual foi relacionado a isolados de *E. coli* extraintestinal com alto potencial de virulência e multirresistentes (CLERMONT *et al.*, 2019). Estudos realizados com isolados de EAEC

mostraram que esses isolados podem encontrar-se distribuídos principalmente nos filogrupos A, B1, B2 e D (FRANÇA *et al.*, 2013; IMUTA *et al.*, 2016).

O regulador transcricional AggR, codificado pelo gene *aggR* (NATARO *et al.*, 1994) é atualmente empregado para diferenciar o patotipo EAEC em típicas, que albergam esse gene, e atípicas, que são desprovidas do gene *aggR* (KAPER *et al.*, 2004). O regulador transcricional AggR é responsável pela expressão de vários genes de virulência, tais como: fimbrias de aderência agregativa (AAF/I – AAF/V), a dispersina (*aap*), o complexo de transporte da dispersina (*aatA-P*) e o Sistema de Secreção do tipo 6 (SST6; *aaia-aaiv*) (MORIN *et al.*, 2013). Segundo Morin *et al.* (2013), os isolados de EAEC típica teriam um potencial maior de causar a doença diarreica, justamente pelo fato da proteína AggR regular a expressão de genes plasmidiais e cromossômicos que estão associados à virulência de EAEC, embora o potencial de EAEC atípica de causar diarreia não possa ser descartado devido seu envolvimento em um surto na Sérvia e no Japão (ČOBELJIĆ *et al.*, 1996; ITOH *et al.*, 1997) e seu frequente isolamento entre indivíduos com diarreia (GIOPPPO *et al.*, 2000; HUANG, JIANG, DUPONT, 2003; ORI *et al.*, 2019).

Um importante fator de virulência de EAEC é a proteína dispersina (Aap), uma proteína antiagregativa que facilita o deslocamento da bactéria pelo epitélio intestinal sem que haja a formação de aglomerados. Esta proteína, ao ser secretada, modifica a carga negativa da superfície da célula bacteriana possibilitando que as fimbrias AAF se projetem e consigam colonizar outro sítio (VELARDE *et al.*, 2007). A dispersina é codificada pelo gene *aap* (*anti-aggregation protein*), localizado no plasmídeo pAA (SHEIKH *et al.*, 2002). O transporte desta proteína para o meio extracelular ocorre pelo sistema de secreção do tipo I chamado complexo ABC (*ATP-binding cassette*), sendo que quatro proteínas, codificadas no operon *aatPABCD*, são requeridas para a secreção da dispersina, assim como a proteína transportadora chamada AatA (NISHI *et al.*, 2003), codificada pelo gene *aatA*, que corresponde ao fragmento sonda denominado de CVD432, presente na cepa protótipo de EAEC 17-2, que foi inicialmente proposto por Baudry *et al.* (1990) como ferramenta de diagnóstico de EAEC.

A patogênese de EAEC tem sido caracterizada pela colonização da mucosa intestinal que é seguida pela produção de enterotoxinas e citotoxinas, ocasionando uma inflamação no epitélio intestinal (NAVARRO-GARCIA, ELIAS, 2011). Alguns potenciais fatores que contribuem para a patogenicidade de EAEC já foram descritos, como adesinas fimbriais e afimbriais (AAF-I, AAF/II, AAF/III, AAF/IV, AAF/V, Ap58, Pil, e ECP), enterotoxinas

(EAST1), citotoxinas (Pet, Pic, SepA, e SigA), a proteína dispersina (Aap) e produção de biofilme.

A primeira adesina (AAF/I) associada ao padrão AA (NATARO *et al.*, 1992) foi descrita em um isolado de EAEC (17-2), do sorotipo O3:H2, obtido de uma criança com diarreia no Chile (VIAL *et al.*, 1988). Os genes responsáveis por codificar as proteínas envolvidas na biogênese desta fimbria estão organizados em um operon (*aggDCBA*), localizado em um plasmídeo conhecido como pAA.

A segunda fimbria (AAF/II) associada ao fenótipo AA foi descrita no isolado de EAEC O42 (O44:H18) (CZECZULIN *et al.*, 1997), obtido a partir de fezes de uma criança com diarreia no Peru (NATARO *et al.*, 1985). Os genes responsáveis por codificar as proteínas que participam da biogênese desta fimbria também estão localizados no pAA e organizados em duas regiões distintas: a região 1 contendo os genes *aafA* e *aafD* e a região 2 albergando os genes *aafB* e *aafC* (ELIAS *et al.*, 1999).

A fimbria AAF/III foi identificada em um isolado de EAEC típica (55989) pertencente ao sorotipo O104:H4, proveniente de um paciente imunocomprometido e com a doença diarreica (BERNIER, GOUNON, Le BOUGUENEC, 2002). Os genes responsáveis pela biogênese da fimbria AAF/III estão localizados no pAA e organizados no operon *agg3DCBA*.

A adesina HdA, posteriormente renomeada para AAF/IV, foi descrita por Boisen *et al.* (2008) no isolado C1010-00 (OR:H1), em um estudo envolvendo indivíduos saudáveis e com diarreia realizado na Dinamarca. Os genes responsáveis pela biogênese da fimbria AAF/III estão localizados no pAA, e organizados no operon *agg4DCBA*.

A fimbria AAF/V foi descrita em um isolado de EAEC (C338-14) proveniente de um estudo clínico realizado na Dinamarca entre o período de 2011 a 2013. A subunidade majoritária (pilina) dessa fimbria é codificada pelo gene *agg5A* (JØNSSON *et al.* 2015). Em estudo posterior realizado com isolados de EAEC obtidos na Dinamarca, observou-se que 3,7% dos isolados apresentavam concomitantemente os genes *agg3A* e *agg5A*, responsáveis por codificar as pilinas das fimbrias AAF/III e AAF/V, respectivamente. Análises genômicas demonstraram que ambos os genes localizavam-se no mesmo plasmídeo, que foi denominado de pAA_{C700-09} (JØNSSON *et al.*, 2017).

Recentemente uma nova fimbria designada *aggregate-forming pili* (AFP) foi identificada em um isolado híbrido de EAEC/STEC; denominada 12-05829; do sorotipo O23:H8), que apresentava o gene *stx2* e foi capaz de produzir o padrão de aderência agregativo. A amostra 12-05829 não albergava o gene responsável por codificar o regulador transcricional AggR, assim como nenhum dos genes responsáveis por codificar as AAF

conhecidas até o momento. Além de apresentar o gene *stx2*, que codifica a toxina Shiga relacionada ao patotipo STEC, esse isolado apresentou o gene *ehxA*, e genes que são relacionados ao patotipo EAEC, tais como *aatA*, *aap*, *aaiC* e *astA* (LANG *et al.*, 2018). No isolado 12-05829, foram identificados três plasmídeos, sendo que em um deles estão localizados genes que seriam responsáveis por codificar proteínas com até 61% de identidade com genes do operon BFP (*bundle-forming pilus*) de EPEC. O operon *bfp* (*bundle-forming pilus*) é um marcador molecular de isolados de EPEC típica e está localizado em um plasmídeo de alto peso molecular conhecido como plasmídeo pEAF (EPEC *adherence fator*) (NATARO, KAPER, 1998). O operon *bfp* alberga 14 genes que são responsáveis por codificar a fimbria BFP que está associada ao fenótipo de aderência localizada (GIRON, HO, SCHOOLNIK, 1991; DONNENBERG *et al.*, 1992). Devido sua identidade com BFP, a nova adesina foi nomeada de *aggregate-forming pili* (AFP) e seu respectivo plasmídeo como pAFP. A organização dos genes nos operons *afp* e *bfp* são similares, apesar do fato do operon *afp* apresentar um gene homólogo ao gene que codifica a subunidade majoritária da fimbria (*afpA*), que foi denominado *afpA2* (LANG *et al.*, 2018). Foi observado que a deleção do operon *afp* completo, do gene *afpA*, que codifica a subunidade majoritária da fimbria, bem como do gene responsável por codificar o regulador AfpR (*afpR*) diminuíram drasticamente o padrão de aderência agregativo no isolado de EAEC/STEC estudado, enquanto que a deleção do gene *afpA2* não alterou o estabelecimento do fenótipo AA em células epiteliais (LANG *et al.*, 2018).

A fimbria Pil foi descrita, primeiramente, em um isolado de EAEC atípica, proveniente de um surto que ocorreu em uma enfermaria neonatal na Sérvia, que não possuía o gene responsável por codificar o regulador transcricional AggR. Este estudo foi importante para evidenciar que existem outros fatores que contribuem para o estabelecimento do fenótipo de aderência agregativa e que isolados desprovidos do gene *aggR* (EAEC atípica) podem causar surtos de diarreia de gravidade comparável aos causados por EAEC típica. A proteína PilS é a principal subunidade do pilus tipo IV denominado Pil, relacionado à produção do padrão AA e formação de biofilme (DUDLEY *et al.*, 2006b). Ademais, Avelino *et al.* (2010) também evidenciaram possível participação de *E. coli common pilus* (ECP) na aderência agregativa, quando outras fimbrias conhecidas não estavam presentes.

Monteiro-Neto *et al.* (2003) descreveram a participação de uma adesina afimbrial, denominada Ap58, como a proteína responsável pelo estabelecimento do padrão AA em isolados de EAEC pertencentes ao sorotipo O111:H12 demonstrando que tanto adesinas fimbriais como adesinas afimbriais podem participar do estabelecimento desse fenótipo.

Um estudo realizado na cidade de Londrina (PR, Brasil) demonstrou que isolados de *E. coli*, provenientes de crianças com diarreia albergavam marcadores de virulência associados ao patotipo EAEC, tais como *aggR*, *astA* e *aap*, e produziam aderência caracterizada pelo arranjo das células bacterianas em cadeias, formando longos cordões, denominado *chain-like adherence* (CLA) (GIOPPPO *et al.*, 2000). Embora poucos estudos tenham tentado esclarecer as estruturas bacterianas associadas à formação do padrão de aderência CLA, Lu *et al.* (2006) evidenciaram a participação do gene *eibG* no estabelecimento do padrão de aderência CLA em um isolado de STEC LEE-negativo (*eae*⁻) do sorogrupo O91. Ademais, foi demonstrado que a adesina autotransportadora antígeno 43 (Agn43), codificada pelo gene *agn43*, é responsável pela ligação bactéria-bactéria, e consequentemente, pela formação de cadeias bacterianas características do padrão CLA (KLEMM *et al.*, 2004).

Após a colonização, isolados de EAEC tem a capacidade de produzir e secretar enterotoxinas e citotoxinas. As principais enterotoxinas descritas até o momento são: EAST-1 (*enteroaggregative heat-stable toxin1*), Pet (*plasmid-encoded toxin*) (SAVARINO *et al.*, 1991; ESLAVA *et al.*, 1998), SigA (*Shigella* IgA-like protease homologue gene), codificadas por genes plasmídeos (BENJELLOUN-TOUIMI, SANSONETTI, PARSOT, 1995), além de Pic (*protein involved in colonization*) (HENDERSON *et al.*, 1999) e SepA (*Shigella* extracellular protease) codificada por genes localizados no cromossomo bacteriano de EAEC (AL-HASANI *et al.*, 2000).

A primeira toxina identificada em EAEC foi EAST-1, uma enterotoxina codificada pelo gene *astA* que está localizado no pAA (SAVARINO *et al.*, 1991). Estudos posteriores mostraram o gene *astA* não é detectado exclusivamente em isolados do patotipo EAEC, sendo esse gene já observado em outros patotipos de ECD, bem como em isolados de *E. coli* desprovidos de marcadores de ECD (HARRINGTON *et al.*, 2006). A toxina EAST-1, caracterizada inicialmente no patotipo EAEC, é relacionada com a toxina termoestável de ETEC (STa) (SAVARINO *et al.*, 1991) e, assim como a toxina STa, age sobre a guanilato ciclase provocando o aumento dos níveis de GMP cíclico, que confere um efeito secretório no epitélio intestinal, como observado em ensaio realizados em *Ussing chamber* utilizando fragmentos de tecido de íleo de coelho (SAVARINO *et al.*, 1991). No entanto, a toxina EAST-1 não estimulou o aumento dos níveis de AMP ou GMP cíclico em estudo realizados *in vitro* com células T84 (células do cólon humano) ou IPEC-J2 (células do intestino delgado de suíno) e experimentos *in vivo* utilizando leitões gnotobióticos, com cinco dias de idade,

inoculados com um isolado de *E. coli* produtor da toxina EAST-1 não apresentaram diarreia 72 horas pós-infecção (RUAN *et al.*, 2012).

As citotoxinas Pet e Pic (ESLAVA *et al.*, 1998; HENDERSON *et al.*, 1999) pertencem à classe das Serinoproteases Autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATE), assim como as proteínas SepA e SigA. Pet é uma citotoxina que altera o citoesqueleto dos enterócitos provocando o arredondamento e o descolamento celular. Sua atividade citotóxica provoca a degradação da α -fodrina, uma proteína presente na membrana dos enterócitos (NAVARRO-GARCIA *et al.*, 1998). A proteína Pic está relacionada com a atividade mucinolítica, colonização intestinal e também pode participar da evasão do sistema imune do hospedeiro (NAVARRO-GARCIA, SONNESTED, TETER, 2010; HENDERSON *et al.*, 1999; ABREU *et al.*, 2015). A proteína autotransportadora denominada SepA, uma SPATE de classe 2, foi primeiramente descrita em *Shigella* spp. e está envolvida nos fenótipos de invasão e inflamação do epitélio intestinal (BENJELLOUN-TOUIMI, SANSONETTI, PARSOT, 1995). Estudos posteriores mostraram que o gene responsável por codificar essa proteína também está presente em isolados do patotipo EAEC, associados a casos de diarreia (BOISEN *et al.*, 2012). A proteína SigA, também identificada originalmente em *Shigella* é codificada pelo gene *sigA*, presente na ilha de patogenicidade *she* de *S. flexneri* 2a, atuando na virulência desses organismos (AL-HASANI *et al.*, 2000).

Estudos realizados nas últimas décadas têm contribuído para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade de isolados pertencentes ao patotipo EAEC, possibilitando a identificação de novos potenciais fatores de virulência que poderiam contribuir para a patogenicidade desses isolados. O gene *aar* (*AggR-activated regulator*), inicialmente denominado como orf61, foi identificado na cepa EAEC 042 e caracterizado como regulador negativo do gene *aggR* (SANTIAGO *et al.*, 2017). A participação da proteína Shf, codificada pelo gene *shf*, tem sido relacionada com a capacidade de isolados de EAEC em formarem biofilmes bacterianos em superfícies abióticas (FUJIMA *et al.*, 2008; DURAND *et al.*, 2016), mas seria de grande importância para o processo de maturação do biofilme (FUJIMA *et al.*, 2008). O gene *air* (*Enteraggregative immunoglobulin repeat protein*), codifica uma proteína de membrana externa bacteriana que se assemelha a invasina de *Yersinia* spp. e a adesina intimina de EPEC, entretanto, esta proteína tem contribuição no fenótipo de aderência ao epitélio intestinal e não confere capacidade invasora aos isolados de EAEC (SHEIKH *et al.*, 2006). O gene *capU* codifica uma hexosiltransferase (CZECZULIN *et al.*, 1999) e tem sido associado com a doença diarreica em crianças sem deficiência nutricional (LIMA *et al.*, 2019).

Uma ilha de patogenicidade cromossomal foi identificada entre isolados de EAEC e compreende o conjunto de 25 genes (*aaiA-aaiY*) que são ativados pelo regulador transcricional *aggR* (DUDLEY *et al.*, 2006a). Estes genes compõem um aparato molecular para a secreção de proteínas efetoras chamado de Sistema de Secreção do Tipo VI (SST6), entre os quais *aaiA*, *aaiC* e *aaiG* tem sido utilizados atualmente para o diagnóstico de EAEC (LIMA *et al.*, 2013; ANDRADE, GOMES, ELIAS, 2014; HAVT *et al.*, 2017; JENSEN *et al.*, 2018). Recentemente um estudo associou este sistema de secreção com a competição bacteriana, pois proteínas com atividade antimicrobiana seriam secretadas diretamente na bactéria alvo, conferindo assim uma característica vantajosa para a sua permanência no ambiente intestinal (NAVARRO-GARCIA *et al.*, 2019).

O fato dos marcadores de virulência, descritos até o momento, não serem encontrados em todos os isolados de EAEC (HARRINGTON *et al.*, 2006), demonstra a heterogeneidade e a plasticidade genômica deste patotipo de *E. coli* diarreiogênica. Outro fato importante a ser destacado no cenário epidemiológico atual é a detecção do patotipo EAEC tanto em fezes de indivíduos diarreicos como em fezes de indivíduos saudáveis (BUERIS *et al.*, 2007; SPANO *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2016), indicando a dificuldade em evidenciar os isolados de EAEC com o verdadeiro potencial patogênico. Neste contexto, o presente estudo, teve o objetivo avaliar o perfil de virulência e resistência de isolados de EAEC obtidos de pacientes com diarreia, assim como identificar possíveis marcadores moleculares que poderiam melhorar o diagnóstico destes isolados.

CONCLUSÃO

Esse é um amplo estudo de caracterização de isolados de EAEC provenientes de casos de diarreia, que reforçou a alta frequência de isolados de EAEC típica como agente etiológico da doença diarreica no Brasil. Ademais, foi possível observar a diversidade de sorotipos e de perfis de genes que codificam fatores de virulência presentes nesses isolados.

Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo a observar a frequência da fimbria de aderência agregativa V (AAF/V) no Brasil e também o primeiro a associar a presença de genes do operon *afp* com o subgrupo de EAEC atípica, identificando uma nova possível ferramenta que poderá contribuir para melhorar o diagnóstico de EAEC atípica nos laboratórios clínicos e de pesquisa.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p.397-406, 2008.
- ABREU, A. G. *et al.* The Serine Protease Pic From Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediates Immune Evasion by the Direct Cleavage of Complement Proteins. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 1, p.106-115, 2015.
- AL-HASANI, K. *et al.* The *sigA* gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p.2457-2463, 2000.
- ANDRADE, F. B. *et al.* Distribution of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 50, p.83-86, 2017.
- ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A.T.; ELIAS, W. P.A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106, p.16-18, 2014.
- ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 20, de 05 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isolado ou em associação. Diário Oficial da União, 9 mai. 2011. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0020_05_05_2011.pdf/fa3ec1c1-8045-4402-b17f-ed189fb67ac8 . Acesso em: fev. 2020.
- ASLANI, M. M. *et al.* Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p.136–139, 2011.
- 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, 2010.
- 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, 1990.
- BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Technical Bulletin of the Registry of Medical Technologists**, v. 36, n. 6, p.49-52, 1966.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 68p.

BENJELLOUN-TOUIMI, Z.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Molecular Microbiology**, v. 17, n. 1, p.123-135, 1995.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; Le BOUGUENEC, 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, 2002.

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, 2008.

BOISEN, N. *et al.* Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p.294-301, 2009.

BOISEN, N. *et al.* Genomic Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* From Children in Mali. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 3, p.431-444, 2012.

BOLL, E. J. *et al.* Role of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Factors in Uropathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 4, p.1164-1171, 2013.

BUERIS, V. *et al.* Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.

CERNA, J. F., NATARO, J. P., ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2138-2140, 2003.

CHATTAWAY, M. A. *et al.* Clonality, virulence and antimicrobial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli* from Mirzapur, Bangladesh. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 10, p.1429-1435, 2017.

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, 2013.

CLERMONT, O. *et al.* Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 8, p.3107-3117, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: CLSI supplement M100. 28. ed. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

ČOBELJIĆ, M. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiology and Infection**, v. 117, n. 1, p.11-16, 1996.

CRAVIOTO, A. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**, v. 3, n. 2, p.95-99, 1979.

CRAVIOTO, A. *et al.* Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **The Lancet**, v. 337, n. 8736, p.262-264, 1991.

CROXEN, M. A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p.822–880, 2013.

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, 1997.

CZECZULIN, J. R. *et al.* Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p.2692-2699, 1999.

DALLMAN, T. J. *et al.* An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases associated with a large multi-pathogen foodborne outbreak in the UK. **Plos One**, v. 9, n. 5, e98103, 2014.

DIAS, R. C. B. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Apmis**, v. 124, n. 4, p.299-308, 2016.

DONNENBERG, M. S. *et al.* A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p.3427-3437, 1992.

DUDLEY, E. G. *et al.* Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p.1267-1282, 2006a.

DUDLEY, E. G. *et al.* An IncII Plasmid Contributes to the Adherence of the Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain C1096 to Cultured Cells and Abiotic Surfaces. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p.2102-2114, 2006b.

DURAND, D. *et al.* *pic* gene of enteroaggregative *Escherichia coli* and its association with diarrhea in Peruvian children. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 6, 2016.

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, 1999.

ELIAS, W. P. *et al.* Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiology and Infection**, v. 129, n. 1, p.49-55, 2002.

ESLAVA, C. *et al.* Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p.3155-3163, 1998.

EWING, W. H. **Edwards & Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier Science Publishing Co.inc., 1986.

FANG, G. D. *et al.* Etiology and Epidemiology of Persistent Diarrhea in Northeastern Brazil. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 21, n. 2, p.137-144, 1995.

FRANÇA, F. L. *et al.* Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS One**, v. 8, 2013.

FRANK, C. *et al.* Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104: H4 Outbreak in Germany. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 19, p.1771-1780, 2011.

FUJIYAMA, R. *et al.* The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Current Microbiology**, v. 56, n. 5, p.474-480, 2008.

GIOPPO, N. M.R. *et al.* Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **Fems Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p.293-298, 2000.

GIRON, J.; HO, A.; SCHOOLNIK, G. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, n. 5032, p.710-713, 1991.

GOMES, T. A. *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, 1998.

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, 2006.

HAVT, A. *et al.* Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 89, n. 2, p.98-105, 2017.

HENDERSON, I. R. *et al.* Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p.5338-5344, 1999.

HUANG, D. B. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* Is a Cause of Acute Diarrheal Illness: A Meta-Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p.556-563, 2006.

HUANG, B. D., JIANG, Z., DUPONT, H. Association of Virulence Factor-Positive and -Negative Enteroaggregative *Escherichia Coli* and Occurrence of Clinical Illness in Travelers From the United States to Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.69, n. 5, p.506-508, 2003.

IKUMAPAYI, U. N. *et al.* Identification of Subsets of Enteroaggregative *Escherichia coli* Associated with Diarrheal Disease among Under 5 Years of Age Children from Rural Gambia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p.997-1004, 2017.

IMUTA, N. *et al.* Phylogenetic analysis of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolates from Japan reveals emergence of CTX-M-14-producing EAEC O25:H4 clones related to sequence type 131. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, p.2128–2134, 2016.

ITO, Y. *et al.* Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2546-2550, 1997.

JENSEN, B. H. *et al.* Characterization of Diarrheagenic Enteroaggregative *Escherichia coli* in Danish Adults—Antibiotic Treatment Does Not Reduce Duration of Diarrhea. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018.

JENSEN, B. H. *et al.* Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p.614-630, 2014.

JØNSSON, R. *et al.* Novel Aggregative Adherence Fimbria Variant of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p.1396-1405, 2015.

JØNSSON, R. *et al.* A Novel pAA Virulence Plasmid Encoding Toxins and Two Distinct Variants of the Fimbriae of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

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

KHALIL, U. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from pediatric population in Pakistan. **Apmis**, v. 124, n. 10, p.872-880, 2016.

KLEMM, P. *et al.* Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p.283-296, 2004.

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 and Infections**, v. 7, n. 1, p.1-16, 2018.

LIMA, A. A. *et al.* Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatrica**, v. 81, n. 383, p.39-44, 1992.

LIMA, A. A. *et al.* Etiology and severity of diarrheal diseases in infants at the semiarid region of Brazil: A case-control study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, 2019.

LIMA, I. F. N. *et al.* Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 5, p.683-693, 2013.

LU, Y. *et al.* A New Immunoglobulin-Binding Protein, EibG, Is Responsible for the Chain-Like Adhesion Phenotype of Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p.5747-5755, 2006.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p.268-281, 2012.

MONTEIRO-NETO, V. *et al.* Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 8, p.533-547, 2003.

MORIN, N. *et al.* Characterization of the AggR Regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p.122-132, 2013.

NATARO, J. P. *et al.* Detection of an Adherence Factor of Enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA Probe. **Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 3, p.560-565, 1985.

NATARO, J. P. *et al.* Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p.2297-2304, 1992.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p.142-201, 1998. Erratum in: *Clinical Microbiology Reviews*. 11(2):403.

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, 1987.

NATARO, J. P. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* Infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 4, p.402-407, 2006.

NATARO, J. P. *et al.* AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 15, p.4691-4699, 1994.

NAVARRO-GARCIA, F. *et al.* *In vitro* effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p.3149-3154, 1998.

NAVARRO-GARCIA, F. *et al.* Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli*: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

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

NAVARRO-GARCIA, F; SONNESTED, M; TETER, K. Host-Toxin Interactions Involving EspC and Pet, Two Serine Protease Autotransporters of the *Enterobacteriaceae*. **Toxins**, v. 2, n. 5, p.1134-1147, 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, 2003.

OKEKE, I. N; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 5, p.304-313, 2001.

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, 1994.

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

ORI, E. L. *et al.* Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. **Epidemiology and Infection**, v. 147, 2019.

RESTIERI, C. *et al.* Autotransporter-Encoding Sequences Are Phylogenetically Distributed among *Escherichia coli* Clinical Isolates and Reference Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p.1553-1562, 2007.

RUAN, X. *et al.* *Escherichia coli* Expressing EAST1 Toxin Did Not Cause an Increase of cAMP or cGMP Levels in Cells, and No Diarrhea in 5-Day Old Gnotobiotic Pigs. **Plos One**, v. 7, n. 8, 2012.

SANTIAGO, A. E. *et al.* The AraC Negative Regulator family modulates the activity of histone-like proteins in pathogenic bacteria. **Plos Pathogens**, v. 13, n. 8, 2017.

SAVARINO, S. J. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 4, p.1450-1455, 1991.

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, 1994.

SCALETISKY, I. C. A. *et al.* Comparison of DNA Hybridization and PCR Assays for Detection of Putative Pathogenic Enteroadherent *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p.1254-1258, 2002.

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

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

SHEIKH, J. *et al.* EilA, a HilA-like regulator in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 2, p.338-350, 2006.

SPANO, L. C. *et al.* Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 359-363, 2008.

TABORDA, R. L. M. *et al.* Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* among diarrheal children in western brazilian Amazon. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 55, n. 4, p.390-396, 2018.

TOMA, C. *et al.* Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal o Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p.2669-2671, 2003.

VELARDE, J. J. *et al.* Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 5, p.1123-1135, 2007.

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, 1988.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 4, p.1441-1445, 1996.

ZAMBONI, A. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Factors Are Found To Be Associated with Infantile Diarrhea in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p.1058-1063, 2004.