



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 Hernandes

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, Prof^o Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes, 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 Prof^o Dr. Waldir P. Elias e à Prof^a 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* diarreio gênica (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).

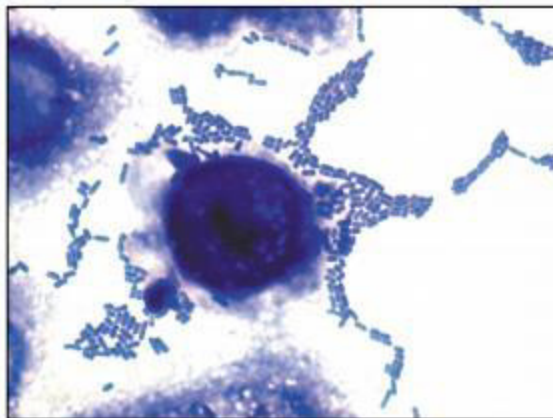


Figura 1. Padrão de aderência agregativa (AA) de um isolado de EAEC em células HEP-2 cultivadas *in vitro* e na superfície da lâmina de vidro. Extraído de Okeke & Nataro, 2001.

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; *aiiA-aiiY*) (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 cromossomais 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 (GIOPPO *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 conseqüentemente, 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 plasmideais (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 (FUJIAMA *et al.*, 2008; DURAND *et al.*, 2016), mas seria de grande importância para o processo de maturação do biofilme (FUJIAMA *et al.*, 2008). O gene *air* (*Enteroaggregative 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.

OBJETIVOS

Caracterizar os isolados de EAEC provenientes de casos esporádicos de diarreia, ocorridos no Brasil entre 2010 a 2016.

Objetivos específicos

- Diferenciar os isolados de EAEC em típicas e atípicas com base na presença do gene *aggR*;
- Determinar os sorotipos (O:H) a que pertencem os isolados de EAEC;
- Classificar os isolados nos distintos grupos filogenéticos de *E. coli*;

- Avaliar o padrão de aderência desses isolados em células HeLa cultivadas *in vitro*;
- Investigar a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos *in vitro*;
- Detectar genes responsáveis por codificar fatores de virulência (plasmideais e cromossomais), tais como: adesinas, toxinas e outras proteínas envolvidas no processo de patogênese de EAEC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados de EAEC

Foram incluídos no presente estudo um total de 220 isolados de EAEC obtidos de amostras de fezes de casos esporádicos de diarreia ocorridos no Brasil. Entre esses isolados, 200 foram obtidos durante um período de sete anos de vigilância epidemiológica (2010 a 2016) realizado pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) (ORI *et al.*, 2019). Além disso, 20 isolados foram obtidos de crianças com diarreia, obtidos entre 2013 e 2014 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, durante um estudo epidemiológico realizado em nosso laboratório (DIAS *et al.*, 2016). No presente estudo, EAEC foi definida como isolados de *E. coli* que albergavam o gene *aatA*, que corresponde a sonda CVD432 (BAUDRY *et al.*, 1990), sendo esses isolados posteriormente classificados em típicas ou atípicas pela presença do gene *aggR* no primeiro grupo (KAPER *et al.*, 2004). O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, UNESP– Faculdade de Medicina de Botucatu (09994419.6.1001.5411).

Determinação do antígeno somático (O) e do antígeno flagelar (H)

A identificação das variantes antigênicas dos antígenos somático (O) e flagelar (H) dos 203 isolados de EAEC, obtidos entre o período de 2011 a 2016 foram determinadas em estudo epidemiológico recente (ORI *et al.*, 2019). Os 17 isolados de EAEC restantes foram obtidos no ano de 2010 e seus sorotipos foram determinados para este estudo. Todos os 220 isolados tiveram seus antígenos (O:H) identificados por metodologia padrão, empregando antissoros específicos O1 a O181 e H1 a H56 (EWING, 1986), produzidos a partir de cepas de referência no Instituto Adolfo Lutz.

Identificação de marcadores de virulência

As suspensões bacterianas contendo o DNA molde a ser empregado nas reações de amplificação foram obtidas por fervura. Três a cinco colônias bacterianas, obtidas a partir do crescimento bacteriano dos isolados de EAEC em placas de Petri contendo ágar MacConkey, foram transferidas para um tubo de polipropileno (tipo eppendorf) contendo 200 µL de água Milli-Q estéril e submetida à fervura por 10 minutos. Após fervura, os tubos foram imediatamente centrifugados e armazenados em freezer (-20°C). Para cada reação foi utilizado 1 µL do DNA molde, 7,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 5,0 µL de H₂O livre de nucleases (incluso no GoTaq Green Master Mix) e 0,34 µM de cada iniciador. As sequências dos iniciadores utilizados para a identificação dos marcadores de virulência estão listadas na Tabela 1.

Após a amplificação da região de interesse do DNA, 5 µl de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose foi preparado fundindo-se agarose (Kasvi, Espanha), por aquecimento, em tampão TBE 1x (Tris – ácido bórico 90 Mm, EDTA 2 Mm, pH 8,0) na concentração final de 1%. A eletroforese foi realizada utilizando como tampão de corrida também o TBE 1x, em uma corrente constante de 100V durante aproximadamente 30 minutos. O marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA) foi utilizado para verificar o tamanho dos produtos amplificados. A coloração do gel com SYBR (Invitrogen, Califórnia, USA), numa concentração de 1:10.000, foi utilizada para a detecção dos amplicons, visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. As imagens foram registradas por sistema de captação de imagens Alphamager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

Identificação do grupo filogenético

A classificação dos 220 isolados de EAEC estudados nos distintos grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E e F) foi realizada através de uma reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) multiplex, conforme descrito por Clermont *et al.* (2013). Além disso, os isolados de EAEC classificados no grupo filogenético B2, apresentando o genótipo: *arpA*⁻, *chuA*⁺, *yjaA*⁻ and *TspE4*⁺ e todos os isolados pertencentes ao grupo filogenético F foram testados em PCR triplex, usando primers e condições descritas recentemente (CLERMONT *et al.* 2019), para confirmação dos isolados de EAEC em B2 e F,

ou a reclassificação dos isolados no grupo filogenético G. Os genes investigados encontram-se descritos na Tabela 2.

Teste de sensibilidade antimicrobiana

O perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos 220 isolados de EAEC foi realizado com base na técnica de disco difusão dos antimicrobianos em ágar Mueller Hinton (OXOID, UK) a partir de discos impregnados (BAUER *et al.*, 1966). O preparo dos antibiogramas e posterior interpretação dos halos de inibição foram feitos segundo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

Os isolados de EAEC foram submetidos aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (AMP; 10 µg) amoxicilina/ácido clavulânico (AMC; 20/10 µg), cefazolina (CFZ; 30 µg), cefepime (CPM; 30 µg), cefotaxima (CTX; 30 µg), cefuroxima (CFX; 30µg), imipenem (IPM; 10 µg), gentamicina (GEN; 10µg), tobramicina (TOB; 10 µg), ciprofloxacina (CIP; 5µg), trimetropim – sulfametoxazol (SUT; 1,25/23,75µg). A ATCC 25922 foi utilizada como controle e os discos com os antimicrobianos impregnados foram cedidos pela Cefar Diagnóstica Ltda., Brasil.

Os isolados de EAEC foram considerados multirresistentes quando apresentaram o fenótipo de resistência a três ou mais classes de antibióticos testados *in vitro*, conforme metodologia descrita acima (MAGIORAKOS *et al.*, 2012; CHATTAWAY *et al.*, 2017).

Tabela 1. Marcadores de virulência utilizados para a pesquisa de isolados de EAEC típica e atípica.

Genes	Descrição	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
Diagnósticos				
<i>aatA</i>	Proteína transportadora antiagregativa	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	SCHMIDT <i>et al.</i> (1995)
<i>aggR</i>	Regulador transcricional	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254	TOMA <i>et al.</i> (2003)
Adesinas Agregativas				
<i>aggA</i>	Subunidade majoritária da pilina da AAF/I	GCGTTAGAAAGACCTCCAATA GCCGGATCCTTAAAAATTAATTCCGGC	432	SAVARINO <i>et al.</i> (1994)
<i>aafA</i>	Subunidade majoritária da pilina da AAF/II	ACATGCATGCAAAAAATCAGAATGTTTGT T CGGGATCCATTTGTCACAAGCTCAGC	550	CZECZULIN <i>et al.</i> (1997)
<i>agg3A</i>	Subunidade majoritária da pilina da AAF/III	GTATCATTGCGAGTCTGGTATTCAG GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG	462	BERNIER, GOUNON, Le BOUGUENEC (2002)
<i>agg4A</i>	Subunidade majoritária da pilina da AAF/IV	TCCATTATGTCAGGCTGCAA GGCGTTAACGTCTGATTTC	411	BOISEN <i>et al.</i> (2008)
<i>agg5A</i>	Subunidade majoritária da pilina da AAF/V	CATGTTCAATTATCTATTAGTTCGCC TCCACCGTACGTCGTCATTA	215	JØNSSON <i>et al.</i> (2015)
<i>eibG</i>	<i>E. coli</i> immunoglobulin-binding	ATCGGCTTTCATCGCATCAGGAC CCACAAGGCGGGTATTCGTATC	508	LU <i>et al.</i> (2006)

Tabela 1. Continuação

Genes	Descrição	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
Operon <i>afp</i>				
<i>afpA2</i>	Subunidade majoritária estrutural do <i>afp</i> (<i>aggregate-forming pili</i>)	ATCGTCTCCGCTGTTAACGG TTTACAAGCATTGGCAGCACCAGC	381	LANG <i>et al.</i> (2018)
<i>afpB</i>	Proteína de membrana	TACAACGATGTCAGGGGTGC TTACCCTGTCGCTTTCCACC	420	LANG <i>et al.</i> (2018)
<i>afpD</i>	Proteína de ligação ao DNA; proteína da família do Sistema de Secreção do tipo II/IV	AGGAAGAACGAGGGAGGGAA CCCAGTGGTCAACAGCTTCT	513	LANG <i>et al.</i> (2018)
<i>afpP</i>	Peptidase prepilina	ATATGGTCGCCACCTTCGAG TCAATGAGGGGCCCATAGGA	586	LANG <i>et al.</i> (2018)
<i>afpR</i>	Regulador do operon <i>afp</i>	GTGAAGAACATTATTGAAGGGGGC CATCACTTAATCGCCAGCGTT	307	LANG <i>et al.</i> (2018)
Toxinas				
<i>astA</i>	Toxina termoestável enteroagregativa (EAST-1)	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111	YAMAMOTO, ECHEVERRIA (1996)
<i>pic</i>	Proteína envolvida na colonização	GGGTATTGTCCGTTCCGAT ACAACGATACCGTCTCCCG	1175	CZECZULIN <i>et al.</i> (1999)
<i>pet</i>	Toxina codificada por plasmídeo	GTGTTTCAACCAGGTTCAACA CCTTCACCAATTTTATGCAGT	1037	GIOPPO <i>et al.</i> (2000)

Tabela 1. Continuação

Genes	Descrição	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>sigA</i>	Protease homóloga IgA-like de <i>Shigella</i>	CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTGTTG	430	BOISEN <i>et al.</i> (2009)
<i>sepA</i>	Protease extracelular de <i>Shigella</i>	GCAGTGGAAATATGATGCGGC TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	794	RESTIERI <i>et al.</i> (2007)
Sistema de Secreção do Tipo VI				
<i>aaiA</i>	Sistema de Secreção do Tipo VI	CCCACGAGTACCAGATAACG GTTTTTCAGGATTGCCATTAG	476	DUDLEY <i>et al.</i> (2006a)
<i>aaiC</i>	Sistema de Secreção do Tipo VI	ATTGTCCTCAGGCATTTACACG <u>GACACCCCTGATAAACAAC</u>	215	Adaptado de LIMA <i>et al.</i> (2013) ^a
<i>aaiG</i>	Sistema de Secreção do Tipo VI	GGGAGTGTTTCAGTCTGGAC TTATCGGTGATAAAGACTACCACTT	808	Adaptado de ANDRADE <i>et al.</i> (2014) ^b
Outros Genes				
<i>aap</i>	Proteína antiagregativa; dispersina	CTTTTCTGGCATCTTGGGT GTAACAACCCCTTTGGAAGT	232	CZECZULIN <i>et al.</i> (1999)
<i>shf</i>	Proteína homóloga à <i>Shigella flexneri</i> ; formação de biofilme	ACTTTCTCCCGAGACATTC CTTTAGCGGGAGCATTTCAT	613	CZECZULIN <i>et al.</i> (1999)
<i>orf3</i>	Proteína críptica	CAGCAACCATCGCATTCTA CGCATCTTTCAATACCTCCA	121	BOISEN <i>et al.</i> (2012)

Tabela 1. Continuação

Genes	Descrição	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>aar</i>	Regulador negativo de <i>aggR</i>	AGCTCTGGAAACTGGCCTCT AACCGTCCTGATTTCTGCTT	108	BOISEN <i>et al.</i> (2012)
<i>air</i>	<i>Enterococcal aggregative immunoglobulin repeat protein</i>	TTATCCTGGTCTGTCTCAAT GGTTAAATCGCTGGTTTCTT	600	HAVT <i>et al.</i> (2017)
<i>capU</i>	Hexosiltransferase homóloga	CAGGCTGTTGCTCAAATGAA GTTCGACATCCTTCCTGCTC	395	BOISEN <i>et al.</i> (2012)

^aAs bases de nucleotídeos sublinhadas se referem a modificações da referência citada.

^bO primer reverse de *aaiG* foi desenhado neste estudo.

Tabela 2. Identificação dos primers utilizados para a identificação do grupo filogenético entre os isolados de EAEC.

Genes	Sequência (5' - 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Quadriplex			
<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	59	288
	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG	59	211
	AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
TspE4.C2	CACTATTCGTAAGGTCATCC	59	152
	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
<i>arpa</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	59	400
	TCTCCCCATACCGTACGCTA		
Grupo E			
<i>arpA</i> (ArpAgpE)	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	57	301
	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG		
Grupo C			
<i>trpA</i> (trpAgpC)	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	59	219
	TCTGCGCCGGTCACGCCC		
Controle interno			
<i>trpA</i> (trpBA)	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	57 ^a /59 ^b	489
	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		
Identificação do grupo filogenético G			
<i>cfaB</i>	CTAACGTTGATGCTGCTCTG	59	384
	TGCTAACTACGCCACGGTAG		
<i>ybgD</i>	TATGCGGCTGATGAAGGATC	59	177
	GTTGACTAAGCGCAGGTCTGA		

^aTemperatura de anelamento utilizada para a determinação do grupo filogenético E, com o gene *arpA* (ArpAgpE). ^bTemperatura de anelamento utilizada para a determinação do grupo filogenético C, com o gene *trpA* (trpAgpC) (CLERMONT *et al.*, 2013; CLERMONT *et al.*, 2019).

Teste de adesão em células epiteliais HeLa

A determinação do padrão de aderência dos isolados de EAEC foi realizada em células HeLa, originárias de câncer de colo de útero, como previamente descrito (CRAVIOTO *et al.*, 1979) com algumas modificações. As células HeLa foram mantidas por cultivos sucessivos à

37°C em atmosfera de 5% de CO₂, em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco; Grand Island, New York, USA) e de 1% de antibiótico (Penicillin-Streptomycin, Sigma; St. Louis, MO, USA). Após a formação da monocamada celular na superfície do frasco, a cultura foi lavada com PBS e descolada com a adição de tripsina (0,25% de EDTA), seguido de agitação manual dos frascos. Após descolamento das células, a tripsina foi inativada com a adição de DMEM com 10% SFB. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células foram novamente ressuspensas em meio de cultura para contagem em câmara de Neubauer. Após a determinação do número de células, foi realizada a diluição em meio DMEM na concentração final de 1×10^5 células/mL, e distribuídas em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, em volume de 1mL por poço. Após o repique em placas de 24 poços, as células HeLa (1×10^5 células/mL) permaneceram em cultura à 37°C, em atmosfera à 5% de CO₂ por aproximadamente 48 horas, até atingirem o estágio de semiconfluência. As amostras bacterianas foram inoculadas a partir de cultura em caldo Luria Bertani por aproximadamente 18 horas à 37°C, na diluição 1:50, em microplacas de 24 poços, contendo células HeLa em meio DMEM suplementado com 2% de soro fetal bovino e 1% de D-manose (Sigma; Saint Louis, MO, USA) e incubadas por um período de 3 horas. Logo após, foram lavadas seis vezes com PBS estéril e, então, fixadas com metanol, coradas com May-Grünwald (Sigma; St. Louis, MO, USA) e Giemsa (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil), e analisadas em microscópio de luz. Quando os isolados foram classificados como não aderentes, ou quando o padrão não pode ser determinado, os isolados de EAEC foram submetidos a ensaios de 6 horas. Nesse ensaio mais prolongado, após 3 horas de incubação, a microplaca foi lavada com PBS estéril e reincubada por mais 3 horas com meio DMEM fresco. Após 6 horas, as preparações foram lavadas seis vezes com PBS estéril e em seguida, fixadas com metanol, para posterior coloração com May-Grünwald/Giemsa. A análise do padrão de aderência foi realizada em microscópio óptico de imersão.

Análise estatística

As diferenças entre os subgrupos de EAEC, típica e atípica, foram investigadas utilizando o teste qui-quadrado (com correção de Yates) ou teste de Fisher (*two-tailed*), quando apropriado. Diferenças com valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativas.

RESULTADOS

A maioria dos isolados obtidos neste estudo foi proveniente de crianças de 0 a 5 anos de idade (62,7%; 138/220). Do total de pacientes, 55,0% (121/220) eram indivíduos do sexo feminino e 45,0% (99/220) do sexo masculino. Os 220 isolados de EAEC deste estudo foram obtidos, predominantemente, do estado de São Paulo (66,8%; 147/220), seguido por Minas Gerais (18,6%; 41/220) e Santa Catarina (14,5%; 32/220) (Tabela 3).

Tabela 3. Dados demográficos relacionados à origem dos isolados de EAEC obtidos no Brasil durante o período de 2010-2016.

Características dos pacientes e dados demográficos	EAEC típica (n = 194)	EAEC atípica (n = 26)	Total (n = 220)
Idade (anos)			
0-5	121 (62,4)	17 (65,4)	138 (62,7)
6-10	2 (1,0)	0	2 (0,9)
11-59	60 (30,9)	8 (30,8)	68 (30,9)
>60	8 (4,1)	1 (3,8)	9 (4,1)
Sem informação	3 (1,5)	0	3 (1,4)
Sexo			
Feminino	109 (56,2)	12 (46,2)	121 (55,0)
Masculino	85 (43,8)	14 (53,8)	99 (45,0)
Origem			
São Paulo (SP)	128 (66,0)	19 (73,1)	147 (66,8)
Minas Gerais (MG)	38 (19,6)	3 (11,5)	41 (18,6)
Santa Catarina (SC)	28 (14,4)	4 (15,4)	32 (14,5)
Ano de isolamento			
2010	14 (7,2)	3 (11,5)	17 (7,7)
2011	7 (3,6)	1 (3,8)	8 (3,6)
2012	23 (11,9)	0	23 (10,5)
2013	29 (14,9)	4 (15,4)	33 (15,0)
2014	38 (19,6)	2 (7,7)	40 (18,2)
2015	30 (15,5)	5 (19,2)	35 (15,9)
2016	53 (27,3)	11 (42,3)	64 (29,1)

O gene *aatA*, que corresponde ao fragmento sonda CVD432 empregado para o diagnóstico de EAEC, foi utilizado para a identificação do patotipo EAEC, sendo assim, 100,0% dos isolados positivos para esse gene. Com base na presença do gene *aggR*, que codifica um regulador transcricional, 88,2% (194/220) dos isolados foram classificados como

EAEC típica ($aatA^+/aggR^+$); enquanto 11,8% (26/220) dos isolados, que não apresentavam o gene $aggR$, foram classificados como EAEC atípica ($aatA^+/aggR^-$) (Figura 2). Logo, podemos observar que o subgrupo de EAEC típica foi prevalente entre os casos de diarreia ocorridos no Brasil, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina (Tabela 3).

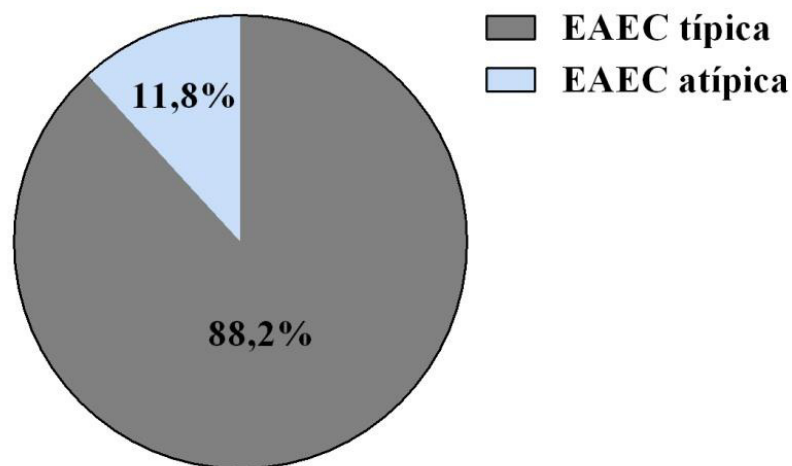


Figura 2. Frequência dos isolados de EAEC típica ($aatA^+/aggR^+$) e atípica ($aatA^+/aggR^-$) obtidos de pacientes com diarreia no Brasil. Observa-se a alta frequência de EAEC típica entre os pacientes com diarreia incluídos neste estudo.

A determinação sorológica dos antígenos somático (O) e flagelar (H) dos isolados de EAEC estudados demonstrou grande diversidade de sorogrupos. Foi identificado que 56,8% dos isolados (125/220) foram distribuídos em 39 sorogrupos diferentes, embora ainda tenham sido identificados isolados com o antígeno somático O não-tipável (19,5%; 43/220) e auto-aglutinante (rugoso) (23,6%; 52/220). Os sorotipos O15:H2 (4,5%; 10/220), O175:H28 (4,5%; 10/220), O73:H1 (4,1%; 9/220) e O153:H2 (3,6%; 8/220) foram detectados com maior frequência e foram exclusivamente identificados entre os isolados de EAEC típica (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação dos sorotipos dos isolados de EAEC típica e atípica.

Sorogrupo ^a	Tipo H ^b	EAEC típica (n = 194)	EAEC atípica (n = 26)	Total (n = 220)
O3	H2	3 (1,5)	0	3 (1,4)
O5	H10	2 (1,0)	0	2 (0,9)
O9	H10	2 (1,0)	0	2 (0,9)
O11	H18	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O15	H2	10 (5,2)	0	10 (4,5)
	H18	4 (2,1)	0	4 (1,8)
O21	H2	7 (3,6)	0	7 (3,2)
O25	H4	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O38	H25	3 (1,5)	0	3 (1,4)
O43	H2	0	1 (3,8)	1 (0,5)
O44	H18	2 (1,0)	0	2 (0,9)
O45	H45	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O55	H21	1 (0,5)	0	1 (0,5)
	H25	0	2 (7,7)	2 (0,9)
O56	H2	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O59	H19	2 (1,0)	0	2 (0,9)
	HNM	3 (1,5)	0	3 (1,4)
O65	H31	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O68	H1	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O73	H1	9 (4,6)	0	9 (4,1)
	H18	4 (2,1)	0	4 (1,8)
	H33	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O77	H18	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O78	H10	0	2 (7,7)	2 (0,9)
O80	H10	0	3 (11,5)	3 (1,4)
O81	H27	0	1 (3,8)	1 (0,5)
O82	H10	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O84	HNM	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O86	H2	3 (1,5)	0	3 (1,4)
O99	H6	3 (1,5)	0	3 (1,4)
O104	H4	2 (1,0)	1 (3,8)	3 (1,4)
O106	H18	2 (1,0)	0	2 (0,9)
	HNM	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O114	H10	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O131	H25	1 (0,5)	0	1 (0,5)
O138	H48	1 (0,5)	0	1 (0,5)

Tabela 4. Continuação

Sorogrupo ^a	Tipo H ^b	EAEC típica (n = 194)	EAEC atípica (n = 26)	Total (n = 220)	
O139	H19	0	1 (3,8)	1 (0,5)	
O153	H2	8 (4,1)	0	8 (3,6)	
	HNM	2 (1,0)	0	2 (0,9)	
O155	H19	2 (1,0)	0	2 (0,9)	
O165	H4	1 (0,5)	0	1 (0,5)	
O168	HNM	4 (2,1)	0	4 (1,8)	
O175	H18	1 (0,5)	0	1 (0,5)	
	H23	1 (0,5)	0	1 (0,5)	
	H28	10 (5,2)	0	10 (4,5)	
	HND	1 (0,5)	0	1 (0,5)	
O176	H33	4 (2,1)	0	4 (1,8)	
	H34	1 (0,5)	0	1 (0,5)	
O179	HNM	1 (0,5)	0	1 (0,5)	
O181	H28	2 (1,0)	0	2 (0,9)	
ONT	H1	1 (0,5)	0	1 (0,5)	
	H2	2 (1,0)	0	2 (0,9)	
	H4	4 (2,1)	0	4 (1,8)	
	H10	14 (7,2)	0	14 (6,4)	
	H18	3 (1,5)	0	3 (1,4)	
	H19	1 (0,5)	0	1 (0,5)	
	H21	3 (1,5)	0	3 (1,4)	
	H32	0	2 (7,7)	2 (0,9)	
	H33	0	1 (3,8)	1 (0,5)	
	HND	2 (1,0)	0	2 (0,9)	
	HNM	9 (4,6)	1 (3,8)	10 (4,5)	
	OR	H2	11 (5,7)	0	11 (5,5)
		H4	2 (1,0)	0	2 (0,9)
		H10	2 (1,0)	2 (7,7)	4 (1,8)
H18		6 (3,1)	0	6 (2,7)	
H21		0	1 (3,8)	1 (0,5)	
H25		2 (1,0)	0	2 (0,9)	
H33		1 (0,5)	3 (11,5)	4 (1,8)	
H35		0	2 (7,7)	2 (0,9)	
H45		0	1 (3,8)	1 (0,5)	
HND		1 (0,5)	0	1 (0,5)	
	HNM	16 (8,2)	2 (7,7)	18 (8,2)	

^aONT: antígeno somático O não-tipável com os soros testados (O1 a O181), OR: rugoso;

^bHNM: isolados não-móveis, HND: antígeno flagellar H não-tipável com os soros testados (H1 a H56).

A maioria dos isolados de EAEC foi classificada nos grupos filogenéticos A (44,1%; 97/220) e B1 (21,4%; 47/220), enquanto que apenas 4,1% (9/220) dos isolados não foram atribuídos a nenhum dos grupos filogenéticos conhecidos (Tabela 5). Com relação ao grupo filogenético A, observamos que o número de isolados de EAEC atípica foi estatisticamente maior do que o número de isolados de EAEC típica identificados nesse filogrupo ($P < 0,05$) (Tabela 5). Inicialmente, observamos que cinco isolados de EAEC típica foram classificados no grupo filogenético F (dados não mostrados), entretanto, de acordo com nova classificação filogenética descrita recentemente por Clermont e colaboradores (2019), esses isolados foram submetidos a uma nova reação de PCR, e reclassificados no grupo filogenético G (2,3%; 5/220).

Tabela 5. Detecção do grupo filogenético entre os isolados de EAEC típicas ($aatA^+/aggR^+$) e atípicas ($aatA^+/aggR^-$) deste estudo.

Grupo Filogenético	EAEC típica (n = 194)	EAEC atípica (n = 26)	Total (n = 220)	Valor de P
A ^a	80 (41,2)	17 (65,4)	97 (44,1)	0.034 ^b
B1	42 (21,6)	5 (19,2)	47 (21,4)	NS ^b
B2	7 (3,6)	0	7 (3,2)	NS ^c
C	4 (2,1)	0	4 (1,8)	NS ^c
D	28 (14,4)	1 (3,8)	29 (13,2)	NS ^c
E	22 (11,3)	0	22 (10,0)	NS ^c
G	5 (2,6)	0	5 (2,3)	NS ^c
Desconhecido	6 (3,1)	3 (11,5)	9 (4,1)	NS ^c

^aDiferença estatisticamente significativa foi observada entre os dois grupos de EAEC estudados ($P < 0,05$).

^{b,c}Diferenças observadas entre isolados de EAEC típicas e atípicas usando o teste qui-quadrado (com correção Yates) (b) ou o teste de Fisher (*two-tailed*) (c), quando apropriado. NS: A diferença foi considerada não significativa.

Entre os genes que codificam as adesinas associadas ao padrão AA, *agg4A* (14,5%, 32/220) e *agg5A* (14,5%, 32/220) foram os mais frequentes entre os isolados de EAEC estudados e, curiosamente, detectados na mesma frequência. Outros genes de virulência que apresentaram alta frequência entre os isolados de EAEC estudados foram os genes que codificam as toxinas, *pic* (57,7%; 127/220) e *astA* (40,5%; 89/220), além *aap* (95,5%; 210/220), *orf3* (89,5%; 197/220) e *aar* (81,8%; 180/220) (Tabela 6).

Doze dos genes de virulência investigados foram detectados mais frequentemente entre os isolados de EAEC típica do que entre os isolados de EAEC atípica ($P < 0,05$), sendo esses genes: *agg4A* (16,5% vs 0), *agg5A* (16,5% vs 0); *pic* (63,4% vs 15,4%), *aap* (99,0% vs 69,2%), *orf3* (99,0% vs 19,2%), *aar* (88,7% vs 30,8%), *air* (30,4% vs 3,8%), *capU* (47,9% vs 19,2%) e *shf* (45,4% vs 15,4%), além dos genes *aaiA* (72,7% vs 46,2%), *aaiC* (62,4% vs 11,5%) e *aaiG* (68,6% vs 19,2%), que codificam o SST6 (Tabela 6).

Os genes do operon *aaiA-Y* pesquisados nesse estudo (*aaiA*, *aaiC* e *aaiG*) foram identificados em 69,5% (153/220) dos isolados de EAEC, sendo que a presença destes três genes concomitantemente foi a combinação mais frequente (55,5%; 122/220). Entretanto, observamos outras combinações, como: *aaiA* e *aaiG* (7,3%; 16/220) e *aaiA* e *aaiC* (0,9%; 2/220), ou ainda somente a ocorrência do gene *aaiA* (5,9%; 13/220) (Tabela 7). Ademais, o perfil genético *aaiA+aaiC+aaiG* foi estatisticamente mais frequente entre os isolados de EAEC típica ($P < 0,0001$), enquanto a ocorrência somente de *aaiA* ou a ausência dos três genes investigados foram características genotípicas mais comuns entre os isolados de EAEC atípica (Tabela 7).

O padrão AA foi identificado em 92,7% (204/220) dos isolados de EAEC deste estudo (Figura 3A; Tabela 8), sendo que, em 2,7% (6/220) desses isolados o padrão AA foi observado concomitantemente com o padrão CLA (Figura 3B). A grande maioria (75,9%; 167/220) dos isolados de EAEC produziram o padrão AA em testes de aderência realizados com 3 horas de infecção, enquanto em 14,1% (31/220) o padrão AA somente pode ser identificado em ensaios de aderência utilizando períodos de incubação mais prolongados. EAEC produzindo o padrão exclusivamente o padrão CLA (1,4%; 3/220) (Figura 3C) ou difuso (AD) (0,9%; 2/220) (Figura 3D) também foram observados; apesar do fato, de 3,6% (8/220) dos isolados permaneceram não aderentes e 1,4% (3/220) aderirem de forma não característica ou indefinida às células epiteliais, mesmo após ensaios de aderência mais prolongados. A maioria dos isolados de EAEC (82,4%; 89/108), que albergavam uma das variantes de AAFs, sozinhas ou em combinação, produziram o padrão AA em teste de aderência de 3 horas, e apenas um isolado que albergava os genes *agg4A* e *eibG*, concomitantemente, produziu o padrão CLA (Tabela 8). Os dois isolados que albergavam os genes *agg3A* e *agg5A*, concomitantemente, produziram o padrão AA. Nota-se que 44,4% (79/178) dos isolados de EAEC típica que produziram o padrão AA não apresentaram nenhum dos genes que codificam as adesinas pesquisadas neste estudo (Tabela 8).

Tabela 6. Frequência dos genes que codificam fatores de virulência em isolados de EAEC típica e atípica deste estudo.

Genes investigados	Número (%) de isolados			Valor de <i>P</i>
	EAEC típica (<i>n</i> = 194)	EAEC atípica (<i>n</i> = 26)	Total (<i>n</i> = 220)	
Adesinas				
<i>aggA</i>	6 (3,1)	0	6 (2,7)	NS ^d
<i>aafA</i>	18 (9,3)	0	18 (8,2)	NS ^d
<i>agg3A</i>	22 (11,3)	0	22 (10,0)	NS ^d
<i>agg4A</i> ^a	32 (16,5)	0	32 (14,5)	0,032 ^d
<i>agg5A</i> ^a	32 (16,5)	0	32 (14,5)	0,032 ^d
<i>afpB</i> ^b	0	14 (53,8)	14 (6,4)	<0,0001 ^d
<i>afpD</i> ^b	0	14 (53,8)	14 (6,4)	<0,0001 ^d
<i>afpP</i> ^b	0	14 (53,8)	14 (6,4)	<0,0001 ^d
<i>afpA2</i> ^b	0	10 (38,5)	10 (4,5)	<0,0001 ^d
<i>afpR</i> ^b	0	14 (53,8)	14 (6,4)	<0,0001 ^d
<i>eibG</i>	1 (0,5)	0	1 (0,5)	NS ^d
Toxinas				
<i>pic</i> ^a	123 (63,4)	4 (15,4)	127 (57,7)	<0,0001 ^c
<i>pet</i>	20 (10,3)	0	20 (9,1)	NS ^d
<i>astA</i>	76 (39,2)	13 (50,0)	89 (40,5)	NS ^c
<i>sigA</i>	18 (9,3)	0	18 (8,2)	NS ^d
<i>sepA</i>	34 (17,6)	4 (15,4)	38 (17,3)	NS ^d
Outros				
<i>aap</i> ^a	192 (99,0)	18 (69,2)	210 (95,5)	<0,0001 ^d
<i>aaiA</i> ^a	141 (72,7)	12 (46,2)	153 (69,5)	0,011 ^c
<i>aaiC</i> ^a	121 (62,4)	3 (11,5)	124 (56,4)	<0,0001 ^c
<i>aaiG</i> ^a	133 (68,6)	5 (19,2)	138 (62,7)	<0,0001 ^c
<i>orf3</i> ^a	192 (99,0)	5 (19,2)	197 (89,5)	<0,0001 ^d
<i>aar</i> ^a	172 (88,7)	8 (30,8)	180 (81,8)	<0,0001 ^d
<i>air</i> ^a	59 (30,4)	1 (3,8)	60 (27,3)	0,009 ^c
<i>capU</i> ^a	93 (47,9)	5 (19,2)	98 (44,5)	0,011 ^c
<i>shf</i> ^a	88 (45,4)	4 (15,4)	92 (41,8)	0,007 ^c

^aForam estatisticamente significantes em EAEC típica do que em EAEC atípica ($P < 0,05$).

^bForam estatisticamente significantes em EAEC atípica do que em EAEC típica ($P < 0,05$).

^{c,d}Diferenças observadas entre isolados de EAEC típicas e atípicas usando o teste qui-quadrado (com correção Yates) (b) ou o teste de Fisher (*two-tailed*) (c), quando apropriado. NS: A diferença foi considerada não significativa.

Tabela 7. Correlação dos genes que codificam o operon *aai* entre os isolados de EAEC típica e EAEC atípica.

Genes do operon <i>aai</i>	Nº (%) de isolados de EAEC			Valor de <i>P</i>
	EAEC típica (<i>n</i> = 194)	EAEC atípica (<i>n</i> = 26)	Total (<i>n</i> = 220)	
<i>aaiA</i> , <i>aaiC</i> , <i>aaiG</i> ^a	119 (61,3)	3 (11,5)	122 (55,5)	<0,0001 ^c
<i>aaiA</i> , <i>aaiC</i>	2 (1,0)	0	2 (0,9)	NS ^d
<i>aaiA</i> , <i>aaiG</i>	14 (7,2)	2 (7,7)	16 (7,3)	NS ^d
<i>aaiA</i> ^b	6 (3,1)	7 (26,9)	13 (5,9)	0,0001 ^d
Nenhum ^b	53 (27,3)	14 (53,8)	67 (30,5)	0,011 ^c

^aForam estatisticamente significantes em EAEC típica do que em EAEC atípica ($P < 0,05$).

^bForam estatisticamente significantes em EAEC atípica do que em EAEC típica ($P < 0,05$).

^{c,d}Diferenças observadas entre isolados de EAEC típicas e atípicas usando o teste qui-quadrado (com correção Yates) (b) ou o teste de Fisher (*two-tailed*) (c), quando apropriado. NS: A diferença foi considerada não significativa.

Considerando os isolados de EAEC atípica, 76,9% (20/26) dos isolados produziram o padrão AA, enquanto 7,7% (2/26) dos isolados não produziram um padrão definido quando aderidos às células epiteliais, e 15,4% (4/26) foram não aderentes. Os genes localizados no operon *afp* (*afpB*, *afpD*, *afpP* e *afpA2*) e o gene codificando o regulador AfpR (*afpR*), responsáveis por codificar a fímbria AFP, foram identificados exclusivamente em 57,7% (15/26) dos isolados de EAEC atípica ($P < 0,0001$) estudados. Entre estes 15 isolados, 66,7% (10/15) albergavam o gene *afpA2*, enquanto os genes *afpB*, *afpD* e *afpP* foram identificados em 93,3% (14/15), assim como o regulador *afpR* (Tabela 6).

Dada a novidade da associação dos genes do operon *afp* com o subgrupo de EAEC atípica, informações relevantes sobre esses isolados foram reunidas na Tabela 9. A maioria dos isolados de EAEC atípica positivos para os genes do operon *afp* e/ou *afpR* foram classificados nos grupos filogenéticos A (80,0%; 12/15). Entre os 14 isolados de EAEC atípica que albergavam os genes do operon *afp*, 85,7% (12/14) produzem o padrão AA (Figura 3), enquanto os outros isolados (14,3%, 2/14) isolados foram classificados como não aderentes. O único isolado a albergar somente o regulador *afpR* aderiu de forma indefinida as células epiteliais (Tabela 9).

Tabela 8. Correlação de genes codificadores de adesinas e padrões de aderência detectados em isolados de EAEC típica e atípica.

Genes que codificam adesinas	No. de isolados de EAEC	Números (%) de isolados de EAEC típica e atípica produzindo os distintos padrões de aderência ^a									
		AA			AD			AA/CLA	CLA	ND	NA
		3 h	6 h	Total	3 h	6 h	Total	3 h	3 h	6 h	6 h
EAEC típica (Total)	194	154 (79,4)	24 (12,4)	178 (91,7)	1 (0,5)	1 (0,5)	2 (1,0)	6 (3,1)	3 (1,5)	1 (0,5)	4 (2,1)
<i>aagA</i>	6	6 (100,0)	0	6 (100,0)	0	0	0	0	0	0	0
<i>aafA</i>	18	18 (100,0)	0	18 (100,0)	0	0	0	0	0	0	0
<i>agg3A</i>	20	18 (90,0)	1 (5,0)	19 (95,0)	0	0	0	0	0	1 (5,0)	0
<i>agg4A</i>	31	17 (54,8)	7 (22,6)	24 (77,4)	0	0	0	4 (12,9)	2 (6,5)	0	1 (3,2)
<i>agg5A</i>	30	29 (96,7)	1 (3,3)	30 (100,0)	0	0	0	0	0	0	0
<i>agg3A+ agg5A</i>	2	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100,0)	0	0	0	0	0	0	0
<i>agg4A+eibG</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (100,0)	0	0
Nenhum	86	65 (75,6)	14 (16,3)	79 (91,9)	1 (1,2)	1 (1,2)	2 (2,3)	2 (2,3)	0	0	3 (3,5)
EAEC atípica (Total)	26	13 (50,0)	7 (26,9)	20 (76,9)	0	0	0	0	0	2 (7,7)	4 (15,4)
<i>afp operon</i>	14	11 (78,6)	1 (7,1)	12 (85,7)	0	0	0	0	0	0	2 (14,3)
<i>afpR</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100,0)	0
Nenhum	11	2 (18,2)	6 (54,5)	8 (72,7)	0	0	0	0	0	1 (9,1)	2 (18,2)
TOTAL	220	167 (75,9)	31 (14,1)	198 (90,0)	1 (0,5)	1 (0,5)	2 (0,9)	6 (2,7)	3 (1,4)	3 (1,4)	8 (3,6)

^aAA: aderência agregativa; AA/CLA: aderência agregativa concomitantemente com *chain-like*; CLA: *chain-like*; AD: aderência difusa; ND: não determinado; NA: não aderente.

Tabela 9. Características moleculares e fenotípicas dos isolados de EAEC atípicos que albergam genes do operon *afp*.

EAEC atípica	Grupo Filogenético	Sorotipo ^a	Padrão de aderência ^b		Operon <i>afp</i>				<i>afpR</i>	Fatores de Virulência
			3 horas	6 horas	<i>afpB</i>	<i>afpD</i>	<i>afpP</i>	<i>afpA2</i>		
IAL 5700	A	OR:H33	AA	-	+	+	+	+	+	<i>aatA</i>
IAL 5742	Desconhecido	OR:H45	AA	-	+	+	+	+	+	<i>aatA, aap, aaiA</i>
IAL 5744	A	ONT:HNM	NA	NA	+	+	+	+	+	<i>aatA, astA, aap, aaiA</i>
IAL 5749	B1	OR:H35	NA	ND	-	-	-	-	+	<i>aatA, aaiA</i>
IAL 5826	B1	OR:H35	AA	-	+	+	+	+	+	<i>aatA, aaiA, aar</i>
IAL 5823	A	ONT:H32	AA	-	+	+	+	+	-	<i>aatA, aap, capU, shf</i>
IAL 5846	A	OR:H33	AA	-	+	+	+	+	+	<i>aatA, aap, orf3, aar</i>
IAL 5852	A	O80:H10	AA	-	+	+	+	-	+	<i>aatA, astA, aap, aaiA, orf3, aar</i>
IAL 5854	A	O80:H10	AA	-	+	+	+	-	+	<i>aatA, astA, aap, orf3</i>
IAL 5892	A	OR:HNM	AA	-	+	+	+	+	+	<i>aatA, astA, aap, aaiA, capU</i>
IAL 5898	A	O55:H25	NA	NA	+	+	+	+	+	<i>aatA</i>
IAL 5901	A	OR:H10	AA	-	+	+	+	-	+	<i>aatA, astA, aap</i>
IAL 5911	A	O55:H25	AA	-	+	+	+	+	+	<i>aatA, aap</i>
IAL 6001	A	OR:H10	ND	AA	+	+	+	-	+	<i>aatA, astA, aap</i>
IAL 6006	A	ONT:H32	AA	-	+	+	+	+	+	<i>aatA, aap, capU, shf</i>

^aONT: antígeno somático O não-tipável com os soros testados (O1 a O181), OR: rugoso; HNM: isolados não-móveis.

^bAA: aderência agregativa; ND: não determinado; NA: não aderente.

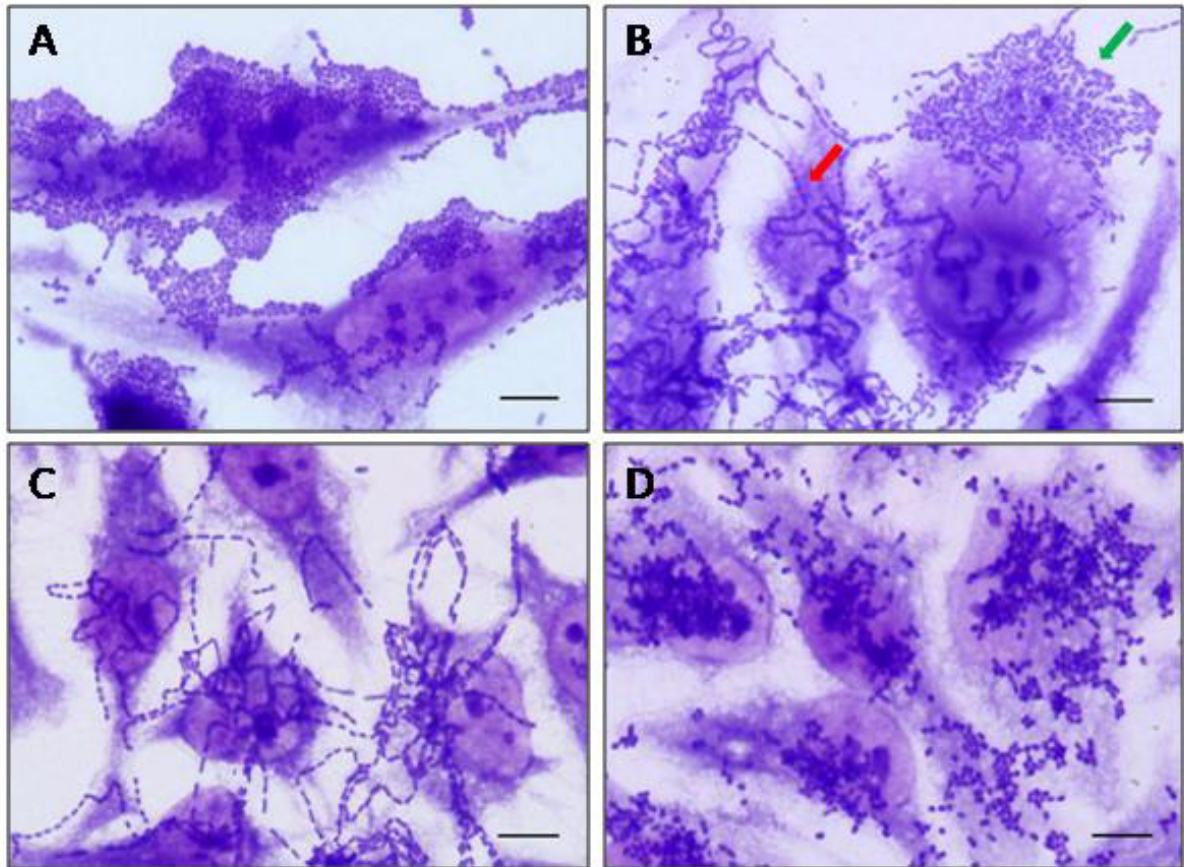


Figura 3. Microscopia óptica ilustrando os principais padrões de aderência observados em isolados de EAEC deste estudo. (A) Isolado IAL5875, aderência agregativa (AA); (B) Isolado IAL5715, aderência agregativa concomitantemente com *chain-like* (AA/CLA); (C) Isolado IAL5738, aderência *chain-like* (CLA); (D) Isolado IAL5759, aderência difusa (AD). Na figura B: a seta verde indica o padrão AA e a seta vermelha indica o padrão CLA. Coloração May-Grunwald-Giemsa. Barra = 10 μ m.

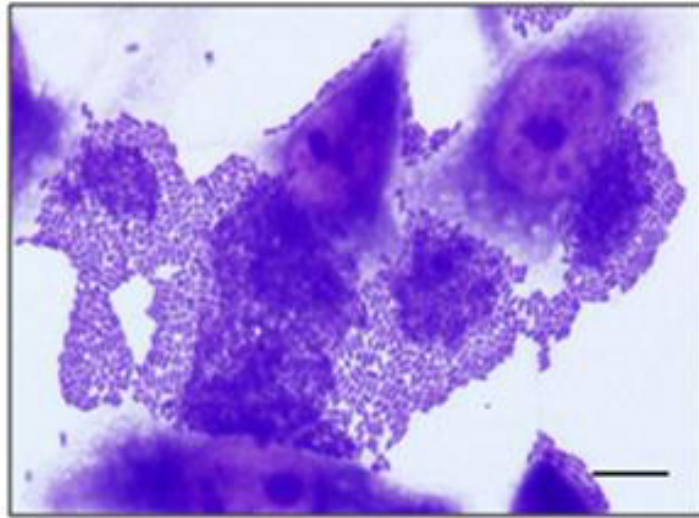


Figura 4. Microscopia óptica ilustrando o padrão de aderência AA no isolado de EAEC atípica *afp*⁺ (IAL6006). Coloração May-Grunwald-Giemsa. Barra = 10 μ m.

A maioria dos isolados de EAEC típica foi sensível aos antimicrobianos testados, embora tenha sido observada resistência à ampicilina (52,6%, 102/194), trimetoprim-sulfametoxazol (33,5%, 65/194), cefazolina (3,6%, 7/194), gentamicina (2,6%, 5/194), amoxicilina-ácido clavulânico (0,5%, 1/194), tobramicina (0,5%, 1/194) e ciprofloxacina (0,5%, 1/194). Por outro lado, entre os isolados de EAEC atípica foi detectada resistência somente à ampicilina (19,2%; 5/26) e trimetoprim-sulfametoxazol (19,2%; 5/26) (Tabela 10). Embora em baixa prevalência, o fenótipo de multirresistência foi identificado exclusivamente em dois isolados de EAEC típica (1,0%, 2/194).

Tabela 10. Susceptibilidade aos antimicrobianos entre isolados de EAEC deste estudo.

Antimicrobianos testados ^a	EAEC típica (n = 194)			EAEC atípica (n = 26)		
	S	I	R	S	I	R
AMP	92 (47,4)	0	102 (52,6)	21 (80,8)	0	5 (19,2)
AMC	187 (96,4)	6 (3,1)	1 (0,5)	26 (100,0)	0	0
CFZ	159 (82,0)	28 (14,4)	7 (3,6)	24 (92,3)	2 (7,7)	0
CFX	194 (100,0)	0	0	26 (100,0)	0	0
CTX	194 (100,0)	0	0	26 (100,0)	0	0
CPM	194 (100,0)	0	0	26 (100,0)	0	0
IPM	194 (100,0)	0	0	26 (100,0)	0	0
GEN	187 (96,4)	2 (1,0)	5 (2,6)	26 (100,0)	0	0
TOB	190 (97,9)	3 (1,5)	1 (0,5)	26 (100,0)	0	0
CIP	193 (99,5)	0	1 (0,5)	26 (100,0)	0	0
SUT	129 (66,5)	0	65 (33,5)	21 (80,8)	0	5 (19,2)

^aAmpicilina (AMP, 10 µg), amoxicilina – ácido clavulânico (AMC, 20/10 µg), cefazolina (CFZ, 30 µg), cefuroxima (CFX, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), cefepime (CPM, 30 µg), imipenem (IPM, 10 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), tobramicina (TOB, 10 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SUT, 1,25/23,75µg).

Interpretação do antibiograma: S, sensível; I, intermediário; R, resistente.

Tabela 11. Combinações de resistência aos antimicrobianos dos isolados de EAEC deste estudo.

β-lactâmicos	Classes de antimicrobianos			EAEC típica (n = 194)	EAEC atípica (n = 26)
	Aminoglicosídeos	Quinolonas	Inibidor via folato		
AMP	-	-	-	39 (20,1%)	2 (7,7%)
AMP, AMC, CFZ,	-	-	SUT	1 (0,5%)	0
AMP, CFZ	-	-	-	1 (0,5%)	0
AMP, CFZ	-	-	SUT	5 (2,6%)	0
AMP	GEN	-	-	3 (1,5%)	0
AMP	GEN	CIP	SUT	1 (0,5%) ^a	0
AMP	GEN, TOB	-	SUT	1 (0,5%) ^a	0
AMP	-	-	SUT	51 (26,3%)	3 (11,5%)
-	-	-	SUT	6 (3,1%)	2 (7,7%)

^aIndicam resistência bacteriana a 3 ou mais classes de antimicrobianos.

DISCUSSÃO

No presente estudo observamos que EAEC típica foi o subgrupo de EAEC mais frequentemente isolado de casos de diarreia na coleção estudada. Entretanto, isolados que não possuíam o gene que codifica o regulador transcricional AggR (EAEC atípica) também foram obtidos. Os isolados de EAEC estudados foram heterogêneos, tanto nas suas características fenotípicas, como nos perfis de virulência detectados.

Embora uma grande diversidade de sorotipos tenha sido observada entre os isolados de EAEC estudados, a ocorrência de EAEC dos sorotipos O104:H4 e O78:H10 chamam atenção devido a sua importância no cenário mundial. O sorotipo O104:H4 ganhou grande relevância após sua correlação com um grande surto de diarreia que ocorreu na Alemanha no ano de 2011 (FRANK *et al.*, 2011). O isolado híbrido de EAEC/EHEC, envolvido nos casos de diarreia e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) ocorridos durante o referido surto, apresentou os genes *aatA*, *aggR*, *aggA*, além do gene *stx2*. Em nosso estudo, identificamos três isolados de EAEC do sorotipo O104:H4, dentre os quais, dois foram classificados como EAEC típica (1,0%) e um como EAEC atípica (3,8%), sendo que o gene *stx* não foi detectado em nenhum desses três isolados. Os dois isolados de EAEC típica apresentavam os genes que codificam a fimbria AAF/III, similar ao isolado de EAEC 55989 (O104:H4) no qual a fimbria AAF/III foi originalmente identificada, enquanto o isolado de EAEC atípica não apresentou nenhum dos genes responsáveis por codificar as AAFs ou AFP.

No presente estudo, dois isolados de EAEC atípica foram classificados no sorotipo O78:H10. Estudos anteriores, já haviam reportado isolados de EAEC do sorotipo O78:H10, bem como de outros sorotipos em infecções do trato urinário (ITU) (OLESEN *et al.*, 1994; BOLL *et al.*, 2013; ABE *et al.*, 2008). Em 1991, em Copenhaga (Dinamarca), uma cepa multirresistente de *E. coli*, do sorotipo O78:H10, foi responsável por um surto de ITU (OLESEN *et al.*, 1994). Análises posteriores de 51 isolados de *E. coli* do sorotipo O78:H10, incluindo a amostra do surto de 1991 em Copenhaga, bem como, outros isolados de *E. coli* provenientes de amostras de urina e fezes, identificaram que 70,0% dos isolados pertenciam à um único grupo clonal dentro do grupo filogenético A, sendo que a maioria dos isolados continham marcadores genéticos tanto de EAEC, como de ExPEC (*Escherichia coli* extraintestinal) (OLESEN *et al.*, 2012), indicando o potencial de isolados desse sorotipo em causar infecções tanto no trato gastrointestinal, como em outros sítios do hospedeiro.

Segundo Clermont *et al.* (2013) os grupos filogenéticos A, B1 e E estão comumente relacionados com *E. coli* diarreiogênica, enquanto os grupos filogenéticos, B2, D e F estão

mais comumente associados aos isolados de ExPEC. Neste estudo, os resultados corroboram com essa descrição, aonde a maioria dos isolados de EAEC foi classificada nos grupos filogenéticos A e B1. Esses achados também são similares ao encontrado em um estudo anterior realizado em São Paulo, aonde houve predomínio de EAEC identificada nos filogenéticos A e B1 (ANDRADE *et al.*, 2017). Recentemente foi descrito o grupo filogenético G, que alberga isolados de *E. coli* extraintestinal que possuem um maior potencial de virulência e que são multirresistentes (CLERMONT *et al.*, 2019). Acreditamos que esse compreenda o primeiro estudo a identificar isolados de EAEC pertencentes a esse filogrupo.

A identificação do patotipo EAEC pela produção do padrão de aderência agregativo em testes com células HeLa/Hep-2 tem sido considerada o padrão ouro. Entretanto, poucos laboratórios conseguem realizar essa triagem em sua rotina. Assim a utilização de marcadores de virulência tem sido eficiente para o diagnóstico desse patógeno. Gomes *et al.* (1998), demonstraram que apenas 67,1% dos isolados de *E. coli*, produtores do padrão AA, também hibridizaram com a sonda EAEC (correspondente ao gene *aata*). Uma vez que o gene *aata* foi utilizado para a identificação laboratorial de EAEC, todos os 220 isolados estudados apresentam o gene *aata*, e 92,7% (204/220) desses isolados produzem o padrão AA. EAEC produzindo padrões de aderência distinto de AA, tais como o padrão difuso (AD) e o padrão CLA, já havia sido descrita na literatura (GOMES *et al.*, 1998; SCALETSKY *et al.*, 2002; GIOPPO *et al.*, 2000). Em nosso estudo também foram identificados padrões de aderência distintos de AA, como o padrão AD, CLA, além de isolados que aderiram de forma indefinida e isolados não aderentes.

Curiosamente, 2,7% dos isolados de EAEC típica apresentaram padrão de aderência AA concomitantemente com o padrão CLA (AA/CLA). A ocorrência do padrão CLA em isolados de EAEC carregando o gene *aggR* (regulador transcricional) já havia sido reportado na literatura anteriormente, em um estudo realizado em Londrina, PR (GIOPPO *et al.*, 2000). Outro estudo relata a frequência do padrão CLA em isolados de STEC (*eae*⁻) classificados nos sorogrupos O157, O26, O111 e O91; sendo que o gene *eibG* foi encontrado somente em isolados do sorogrupo O91 (21,0%, 36/171) (LU *et al.*, 2006). Dos três isolados de EAEC típica que apresentaram unicamente o padrão CLA, somente um isolado albergou o gene *eibG*, concomitantemente com o gene *agg4A*, e foi identificado no sorotipo O155:H19. Esses dados sugerem que outras possíveis adesinas, ainda não identificadas, possam estar relacionadas ao estabelecimento do padrão CLA entre isolados de EAEC.

A baixa ocorrência dos genes associados à biogênese das fimbrias AAF/I (*aggA*) e AAF/II (*aafA*) está em concordância com estudos realizados tanto no Brasil (ELIAS *et al.*, 2002) como na África (BOISEN *et al.*, 2012). No entanto, um estudo realizado em Fortaleza, (Ceará, Brasil), detectou o gene *aggA* em cerca de 50,0% dos isolados de EAEC (HAVT *et al.*, 2017). O gene *agg3A* também tem sido detectado em baixa frequência entre isolados de EAEC obtidos no Brasil (HAVT *et al.*, 2017) e na África (BOISEN *et al.*, 2012). Um cenário diferente do exposto acima foi observado em um estudo que abrangeu várias regiões geográficas do Brasil, onde o gene *agg3A* foi identificado em 27,5% dos isolados de EAEC (ZAMBONI *et al.*, 2004).

Os genes *agg4A* e *agg5A* estão entre os genes associados a biogênese de fimbrias agregativas mais frequentemente detectados nos isolados do presente estudo. Até aonde sabemos, esse é o primeiro estudo a identificar isolados de EAEC portadores do gene *agg5A* no Brasil. A ocorrência dos genes *agg4A* e *agg5A*, observada em nosso estudo, é similar ao observado em isolados de EAEC obtidos na Dinamarca (JENSEN *et al.* 2018) e em Mali (BOISEN *et al.*, 2012). Ademais, somente 1,0% (2/194) dos isolados de EAEC típica apresentaram genes que codificam as pilinas majoritárias da fimbria AAF/III e AFF/V (*agg3A* e *agg5A*) concomitantemente. No entanto, isolados apresentando estes dois genes já tinham sido descritos anteriormente e o operon albergando genes que codificam as subunidades majoritárias das duas pilinas foram identificadas em uma nova variante do pAA (pAA_{C700-09}) (JØNSSON *et al.*, 2017).

Observou-se ainda que grande parte dos isolados de EAEC não albergou nenhum dos genes responsáveis por codificar a pilina das cinco AAFs conhecidas até o momento, fato que também tem sido observado em outros estudos caracterizando isolados de EAEC já publicados na literatura (BOISEN *et al.*, 2009; JØNSSON *et al.*, 2015). Esses dados sugerem que outras fimbrias, ou variantes genéticas das AAFs já descritas até o momento, possam estar presentes no genoma desses isolados e serem responsáveis pelo estabelecimento do padrão AA.

Recentemente, uma nova adesina, denominada *aggregate-forming pili* (AFP), codificada por genes localizados no operon *afp*, foi associada ao estabelecimento do padrão AA em um isolado híbrido de EAEC/STEC (LANG *et al.*, 2018). Genes localizados no operon *afp*, bem como o gene responsável por codificar o regulador AfpR (*afpR*), foram identificados em 57,7% dos isolados de EAEC atípicas, dos quais a grande maioria foram classificados no grupo filogenético A. Como a identificação do operon *afp* é um fato recente, até aonde temos conhecimento, esse é o primeiro estudo a investigar a ocorrência dos genes

do operon *afp* em uma ampla coleção de isolados de EAEC típica e atípica, muito embora o estudo que descreveu a fimbria AFP, utilizando de ferramentas para análise *in silico*, já apontava para a ocorrência desse operon em isolados de *E. coli* com o genótipo: *aatA*⁺/*aggR*⁻ (LANG *et al.*, 2018). A ocorrência de genes desse operon exclusivamente em isolados de EAEC atípica constitui um achado de grande importância para melhorar as ferramentas de diagnóstico de EAEC, uma vez que entre todos os outros genes codificadores de fatores de virulência conhecidos até o momento, nenhum havia mostrado uma associação estatística com esse subgrupo de EAEC.

Entre os genes que codificam toxinas, *pic* e *astA*, foram os mais frequentes, sendo que o gene *pic* foi o único gene entre as toxinas que mostrou associação estatística com os isolados de EAEC típica ($P < 0,05$), assim como observado em um estudo anterior realizado em São Paulo (ANDRADE *et al.*, 2017). A frequência de isolados de EAEC albergando o gene *pic* foi similar ao observado em um estudo realizado em Fortaleza, onde esse gene foi detectado em 56,0% dos isolados de EAEC provenientes de crianças nutridas e malnutridas (HAVT *et al.*, 2017). Em um estudo realizado em Rondônia, o gene *pic* foi detectado em somente 25,9% de isolados de EAEC provenientes de amostras de fezes de crianças com diarreia (TABORDA *et al.*, 2018). Com relação ao gene *astA*, frequência superior ao observado na presente investigação foi encontrada em estudos realizados em Fortaleza (60,0%) e em Rondônia (64,7%) (HAVT *et al.*, 2017; TABORDA *et al.*, 2018). Os genes *sepA*, *pet* e *sigA* foram detectados em frequência similar ao observado em estudos anteriores realizados em dois estados Brasileiros: São Paulo e Rondônia (ANDRADE *et al.*, 2017; TABORDA *et al.*, 2018). No presente estudo, os genes *pet* e *sigA* não foram detectados nos isolados de EAEC atípicas estudados, entretanto, o gene *pet* foi identificado em 3,2% de isolados de EAEC atípica em estudo realizado em Rondônia, e *sigA* em 1,2% dos isolados desse subgrupo em um estudo realizado em São Paulo (TABORDA *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2017).

Estudos recentes têm proposto à utilização de genes cromossômicos, localizados no operon *aai*, como marcadores adicionais para o diagnóstico laboratorial de EAEC (BOISEN *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2014). Em nosso estudo foi observado que todos os isolados que apresentavam os genes *aaiC* e/ou *aaiG* também apresentavam o gene *aaiA*, indicando ser este último um marcador mais eficiente na identificação deste operon entre os isolados de EAEC.

Outros genes que codificam fatores de virulência também foram detectados entre os 220 isolados de EAEC estudados, como os genes *aar*, *capU*, *orf3* e *air*. Esses genes também

já foram detectados entre isolados de EAEC em vários estudos realizados em diversas regiões geográficas (HAVT *et al.*, 2017; TABORDA *et al.*, 2018 ; DURAND *et al.*, 2016; BOISEN *et al.*, 2012). Em um estudo caso-controle, o gene *aar* (conhecido como *orf61*) foi identificado com maior frequência entre isolados de EAEC obtidos de indivíduos sem a doença diarreica (LIMA *et al.*, 2013). Embora esses genes sejam detectados em isolados de EAEC, o seu papel na patogênese e no estabelecimento da doença diarreica ainda é pouco conhecido. Outros estudos ainda serão necessários para compreendermos se os fatores de virulência codificados por esses genes são essenciais para os isolados de EAEC se estabelecerem no trato gastrointestinal, bem como causar danos aos enterócitos levando a um quadro de diarreia.

Entre os isolados de EAEC, foi observada elevada sensibilidade aos antimicrobianos testados, apesar de resistência à ampicilina e trimetoprim-sulfametoxazol ter sido observada. Alta resistência dos isolados de EAEC a esses antimicrobianos foram observadas em estudos caso-controle realizados em diferentes regiões geográficas como: Gambia, Bangladesh e Dinamarca (IKUMAPAYI *et al.*, 2017; CHATTAWAY *et al.*, 2017; JENSEN *et al.*, 2018).

Com relação à ciprofloxacina, foi observada baixa taxa de resistência dos isolados desse estudo (EAEC típicas e atípicas), sendo que outros estudos relatam taxas de resistência mais altas, como, por exemplo, estudos realizados no Reino Unido (5,0%), Gambia (9,0%), Bangladesh (13,4%) e Dinamarca (34,0%) (DALLMAN *et al.*, 2014; IKUMAPAYI *et al.*, 2017; CHATTAWAY *et al.*, 2017; JENSEN *et al.*, 2018). Poucos isolados de EAEC típica foram classificados como multirresistentes, diferentemente do observado em outros estudos que relataram alta prevalência do fenótipo de multirresistência, como estudos realizados no Paquistão (97,0%), Bangladesh (75,8%), e na Dinamarca (58,0%) (KHALIL *et al.*, 2016; CHATTAWAY *et al.*, 2017; JENSEN *et al.*, 2018). Podemos inferir que a baixa taxa de resistência aos antimicrobianos observada entre os isolados de EAEC desse estudo, se deva ao fato da doença diarreica ser uma doença autolimitada, sem recomendação de uso de antimicrobianos. Além disso, por determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o uso de antimicrobianos no Brasil se tornou mais controlado (ANVISA, 2011).

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.
- ITOH, 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.
- SCALETSKY, 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 of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p.2669-2671, 2003.

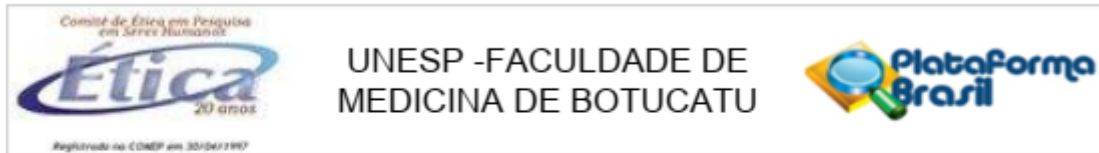
VELARDE, J. J. *et al.* Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 5, p.1123-1135, 2007.

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.

APÊNDICE A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil de virulência e epidemiologia molecular de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) isoladas de casos esporádicos e possíveis surtos de diarreia no Brasil: Um estudo retrospectivo de 2010 a 2016

Pesquisador: REGIANE CHRYSOSTOMO BITENCORT DIAS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09994419.6.1001.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.244.580

APÊNDICE B – COAUTORIA EM ARTIGO PUBLICADO

Epidemiology and Infection

cambridge.org/hyg

Original Paper

Cite this article: Ori EL *et al* (2019). Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. *Epidemiology and Infection* **147**, e10, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002595>

Received: 24 January 2018

Revised: 14 August 2018

Accepted: 20 August 2018

Key words:

Bacterial infections; diarrhoea; *Escherichia coli* (*E. coli*); molecular epidemiology; surveillance

Author for correspondence:

L. F. Dos Santos,
E-mail: luisfemando.lfs@uol.com.br

Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance

E. L. Ori¹, E. H. Takagi², T. S. Andrade², B. T. Miguel², M. C. Cergole-Novella³, B. E. C. Guth⁴, R. T. Hernandez⁵, R. C. B. Dias⁵, S. R. S. Pinheiro¹, C. H. Camargo¹, E. C. Romero¹ and L. F. Dos Santos¹

¹Adolfo Lutz Institute-Centre of Bacteriology (National Reference Laboratory for *Escherichia coli* Enteric Infections), Sao Paulo, Brazil; ²Adolfo Lutz Institute-Centre of Interdisciplinary Procedures (Culture Collections of Microorganisms), Sao Paulo, Brazil; ³Adolfo Lutz Institute-Regional Laboratory of Santo André, Sao Paulo, Brazil; ⁴Universidade Federal de São Paulo, Sao Paulo, Brazil and ⁵Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil

Abstract

Diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC) is a leading cause of infectious diarrhoea worldwide. In recent years, *Escherichia albertii* has also been implicated as a cause of human enteric diseases. This study describes the occurrence of *E. coli* pathotypes and serotypes associated with enteric illness and haemolytic uremic syndrome (HUS) isolated in Brazil from 2011 to 2016. Pathotypes isolated included enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). PCR of stool enrichments for DEC pathotypes was employed, and *E. albertii* was also sought. O:H serotyping was performed on all DEC isolates. A total of 683 DEC and 10 *E. albertii* strains were isolated from 5047 clinical samples. The frequencies of DEC pathotypes were 52.6% (359/683) for EPEC, 32.5% for EAEC, 6.3% for ETEC, 4.4% for EIEC and 4.2% for STEC. DEC strains occurred in patients from 3 months to 96 years old, but EPEC, EAEC and STEC were most prevalent among children. Both typical and atypical isolates of EPEC and EAEC were recovered and presented great serotype heterogeneity. HUS cases were only associated with STEC serotype O157:H7. Two *E. albertii* isolates belonged to serogroup O113 and one had the *stx2f* gene. The higher prevalence of atypical EPEC in relation to EAEC in community-acquired diarrhoea in Brazil suggests a shift in the trend of DEC pathotypes circulation as previously EAEC predominated. This is the first report of *E. albertii* isolation from active surveillance. These results highlight the need of continuing DEC and *E. albertii* surveillance, as a mean to detect changes in the pattern of pathotypes and serotypes circulation and provide useful information for intervention and control strategies.

Introduction

Escherichia coli is as one of the most important enteric human pathogens worldwide [1]. Strains of *E. coli* causing enteric diseases are collectively designated diarrhoeagenic (DEC) and are currently divided into six main categories or pathotypes based on defined virulence attributes. The known DEC pathotypes are named enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) [2].

EPEC and EAEC induce diarrhoea through their ability to adhere to host intestinal mucosa, leading to the formation of attaching and effacing (A/E) lesions in the case of EPEC and the aggregative adhesion (AA) pattern in the case of EAEC [2, 3]. Genes such as *eae* for A/E lesion and *aaf* (AA fimbriae) for AA, among others, are responsible for the production of these featured adhesion phenotypes [3, 4]. As pathogenic groups both EPEC and EAEC are subdivided in typical and atypical strains. For EPEC, this division is based upon the presence of EAF plasmid (pEAF) in typical (tEPEC) strains and its absence in atypical (aEPEC) ones [4]. The pEAF contains in its structure an operon termed *bfp*, which is responsible for the production of a type IV pilus named *bundle-forming pilus* (BFP). BFP is thought to be involved in bacteria to bacteria interactions during the host colonization by EPEC [4]. The occurrence of gene *aggR* defines typical EAEC strains while atypical EAEC are devoid of this marker [2]. Gene *aggR* is regarded as a major transcriptional regulator of many of the genes responsible for EAEC virulence factors production [3]. STEC and ETEC damage the host mainly by elaborating and secreting toxins [2]. STEC produces Shiga toxins (Stx). There are two distinct Stx types, Stx1 and Stx2 [4] with 10 subtypes, 1a, 1c and 1d for Stx1, and 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f and 2g for Stx2 [5]. ETEC produces thermolabile (LT) and thermostable (ST) enterotoxins.

© The Author(s) 2018. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

Both LT and ST toxins can also be divided into the distinct antigenic types LT-I and LT-II and ST-I and STII. Furthermore, ST-I may present human (ST_h) and porcine (ST_p) variant forms [2]. EIEC phenotypically resemble the genus *Shigella*. They are capable of invading the host intestinal mucosa and this invasive behaviour relies on a complex array of effector molecules which are employed by the bacteria in order to penetrate, evade immune response and replicate within intestinal cells [5]. The consequent inflammatory response triggered against the invasion process leads to the damage of the intestinal epithelia, characteristic of the bacillary dysentery [2].

In addition to *E. coli*, another species within the genus *Escherichia*, *E. albertii*, can also be a human pathogen. *E. albertii* was isolated for the first time from a diarrhoeic child in Bangladeshi and misidentified as *Hafnia alvei* [6]. Currently, *E. albertii* is considered an 'emerging' human enteric pathogen. Similarly to EPEC, *E. albertii* also harbours the *eae* gene and thus may produce A/E lesions. Some isolates may possess additional virulence determinants like cytolethal distending and Stx toxins [7].

EPEC, EAEC and ETEC are leading bacterial causes of acute childhood diarrhoea worldwide [8]. EPEC and EAEC have also been implicated in prolonged diarrhoeal diseases and ETEC along with EAEC are agents of the so-called 'traveller diarrhoea'. On the other hand, STEC strains have been linked with large outbreaks of diarrhoea, and with the occurrence of haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome (HUS) [9].

In Brazil, the presence of DEC strains has been investigated in young children, in studies conducted at specific geographic locations [10]. However, there are no reports assessing the occurrence of DEC pathotypes from official surveillance programmes and involving patients from all age groups. Given the heterogeneous nature of DEC strains and their ability to emerge in new pathogenic forms through the gain or loss of genetic material [11], monitoring their virulence traits is of great utility as it can inform on outbreak detection. In order to provide useful epidemiologic data on the occurrence of DEC in Brazil, the present study aimed to describe the pathotypes and serotypes of *E. coli* and *E. albertii* strains associated with human infections.

Material and methods

Bacterial strains

The Brazilian Reference Laboratory for *E. coli* enteric infections Adolfo Lutz Institute (IAL) receives clinical isolates biochemically characterized as *E. coli* from several regional and local public health laboratories for molecular pathotype identification and serotyping. From January of 2011 to December of 2016, *E. coli* isolates representing 5047 cases of human infection, including two cases of HUS, were sent to our laboratory for this purpose. Of these, 82 cases had been previously analysed during the investigation of outbreaks of diarrhoea in the years of 2012 and 2013 [12]. These cases were also included in this study as they contribute to the total cases recorded in the period of the present study. The cases encompassed subjects of all age groups. Due to the fact that commensal *E. coli* is the predominant facultative anaerobe in the human gut, for the identification of diarrhoeagenic strains, it is necessary to evaluate more than one *E. coli*-like colony from the same patient. In our laboratory, five to 10 *E. coli* colonies from each patient are routinely received for the characterization of DEC-specific virulence markers. If more than one colony of the same pathotype is found to be positive, only one colony is

considered in each case. In the present study, cases of mixed infection (two distinct DEC pathotypes occurring in the same patient) were not considered. This study also employed reference strains serving as positive controls for each of the following DEC pathotypes: EPEC (E2369/48), EAEC (17-2), ETEC (H10407), STEC/EHEC (EDL933), EIEC (*Shigella flexneri*, CDC2a). The commensal *E. coli* K12:H5 served as a negative control for molecular and phenotypic procedures.

DEC pathotypes investigation

Screening for specific virulence genes (Table 1) defining the five most relevant DEC pathotypes (EPEC, EAEC, STEC, ETEC and EIEC) was performed by a multiplex PCR assay. For EPEC, the *eae* gene which is located in the pathogenicity island locus of enterocyte effacement (*LEE*) and is responsible for the production of the adhesin intimin was employed. For EAEC, the *aatA* gene encoding a protein related to an ATP-binding cassette transport system was used. For STEC, genes *stx1* and *stx2*, which are bacteriophage-borne and related to the production of the Stx1 and Stx2 toxins respectively, were chosen. For ETEC, we used *ltA* and *stA* related to LT and ST toxins production, and for EIEC, the detection target was *ipaH* gene, which is associated with the invasion plasmid antigen H. Primers sequences and amplification parameters employed in the assays are described in Table 1. Template DNA for PCR reactions was produced by boiling bacterial suspensions from individual *E. coli* colonies cultivated on Tryptic Soy agar. After bacterial lysates preparation, five to 10 colonies from each patient were pooled and tested. If a given pool was positive, individual colonies forming this pool were retested with primers for the corresponding amplified gene. If a positive result was achieved, the corresponding colony was confirmed as positive.

E. albertii investigation

E. albertii was investigated by a triplex PCR assay recently described by Lindsey et al. This PCR targets cyclic di-GMP regulator gene (*cdgR*), DNA-binding transcriptional activator of cysteine biosynthesis gene (*EAKF1_ch4033*) and palmitoleoyl-acyl carrier protein-dependent acyltransferase gene (*EFER_0790*) allowing discrimination among *E. coli*, *E. albertii* and *E. fergusonii* [16].

Shiga toxin genes (*stx*) subtyping

Strains presenting *stx1* and/or *stx2* genes were subjected to *stx* subtyping by PCR employing the primers and amplification conditions proposed by Scheutz et al. [17].

Identification of typical and atypical EPEC/EAEC strains and ETEC ST toxin gene (*st*) variants

Strains presenting *eae* and *aatA* genetic markers were further investigated for *bfp* and *aggR* genes (Table 1) defining typical EPEC and EAEC, respectively. Strains negative for these genes were classified as atypical EPEC/EAEC. ST toxin gene (*st*)-positive ETEC strains were submitted to an additional duplex PCR (Table 1) in order to investigate the presence of human and porcine variants.

Phenotypic differentiation between EIEC and *Shigella* strains

Given that *ipaH* genetic marker can be present in both EIEC and *Shigella*, and the possible occurrence of cross-reactivity among

Table 1. Primer sequences, target genes and amplification conditions employed in multiplex and individual PCR assays for characterizing DEC strains analysed in this study

Target gene (product/related DEC pathotype)	Primers sequences (5'-3')	Amplification conditions	Amplicon size	Reference
<i>stx1</i> (Shiga toxin type I/STEC)	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	95 °C 5', 95 °C 40'', 58 °C 1', 72 °C 2' (40 cycles)	188	[13]
<i>stx2</i> (Shiga toxin type II/STEC)	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		255	
<i>eae</i> (intimin/STEC and EPEC)	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG		384	
<i>ipaH</i> (protein associated with pINV plasmid/ EIEC)	CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC		917	
<i>ltA</i> (thermo-labile toxin/ETEC)	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATCCCTGTT		450	
<i>stA</i> (thermostable toxin/ETEC)	ATTTTMTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT		190	
<i>aatA</i> (protein associated with an ATP-binding cassette transporter system/EAEC)	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT		630	
<i>bfpA</i> (Bfp fimbriae/EPEC)	CAATGGTGCTTGCCTTGCT GCCGCTTTATCCAACCTGGT	95 °C 5', 94 °C 1', 56 °C 2', 72 °C 1' (30 cycles)	324	
<i>aggR</i> (transcriptional virulence regulator/EAEC)	CTAATGTACAATCGATGTA ATGAAGTAATTCTTGAAT	95 °C 5', 94 °C 1', 40 °C 1', 72 °C 1' (30 cycles)	308	[14]
<i>sth</i> (human variant of ETEC thermostable toxin/ ETEC)	TTCACCTTCCCTCAGGATG CTATTCATGCTTTCAGGACCA	95 °C 5', 94 °C 30'', 52 °C 30'', 72 °C 1' (35 cycles)	120	[15]
<i>stp</i> (porcine variant of ETEC thermostable toxin/ ETEC)	TCTTCCCTCTTTTAGTCAG ACAGGCAGGATTACAACAAG		166	

serogroups of these two bacteria in serological tests, all the strains positive for *ipaH* gene in PCR assays were submitted to an extended biochemical profiling [18]. Only strains positive for citrate, mucate and sodium acetate utilization were considered as EIEC.

Serotyping

Strains classified in any of the DEC pathotypes investigated by PCR were O:H serotyped by tube agglutination assays [18] employing absorbed somatic (O1-O188) and flagellar antisera (H1-H56) produced at IAL. Non-motile ETEC strains of serogroup O6 were subjected to PCR-RFLP in order to identify the allelic forms of their *fliC* genes [19].

Cytotoxicity assays

Strains harbouring *stx* genes were confirmed as STEC in cytotoxic assays employing cultured Vero cells [20].

Statistical analyses

The χ^2 test was employed to test the hypothesis that the distribution of each pathotype was not homogeneous among the distinct age groups of patients. The analysis was performed with SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC). *P*-value of <0.05 was considered to indicate statistically significant differences.

Results and discussion

DEC strains are considered major aetiological agents of diarrhoeal diseases in Brazil, and worldwide [1, 10, 21]. Nevertheless, updated information on DEC circulation in Brazilian settings is

not currently available. Patterns in the circulation of diarrhoeagenic pathotypes and serotypes tend to change over time and may vary between different countries. Therefore, the primary aim of this study was to describe the occurrence of pathotypes and serotypes of DEC isolated from sporadic and outbreak cases of acute diarrhoea and HUS, during a period of 6 years of active epidemiological surveillance, performed in different Brazilian states. However, among diarrhoeagenic *eae*-harbouring *E. coli*-like colonies, we identified 10 *E. albertii* isolates, and the objective of this study was extended to encompass the analysis of such isolates.

A total of 693 (13.7%) cases were positive for DEC or *E. albertii*. DEC strains representing one of the five major pathotypes were detected as the sole enteric pathogen in 683 (13.5%) cases. *E. albertii* could be found in 10 (0.2%) of the total cases. The frequency of DEC strains reported in the present study is similar to previously reported data for China and Nigeria [22, 23], but lower than that reported in Mexico [24]. However, the real prevalence of DEC in Brazil could be greater, since in a large number of diarrhoeal cases reported, including outbreaks, the aetiological agents are not identified due to insufficient epidemiological investigation or technical limitations. The reliable classification of DEC into distinct pathotypes requires the use of molecular tools. Since many local public health laboratories in Brazil are not adequately equipped to perform molecular techniques, most DEC infections are probably missed.

Figure 1a shows the distribution of the different DEC pathotypes among positive DEC strains in this study. The most frequent pathotype was EPEC, found in 359 (52.6%) of the positive DEC cases, followed by EAEC present in 222 (32.5%) of the cases. ETEC, EIEC and STEC were identified in 43 (6.3%), 30 (4.4%) and 29 (4.2%) of the positive cases, respectively. By comparing

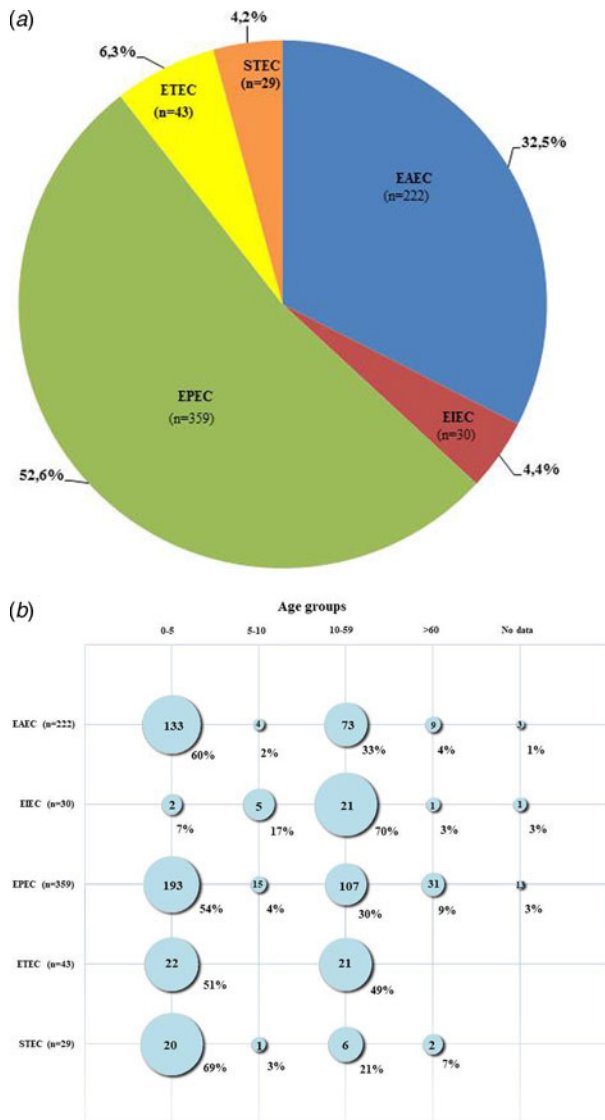


Fig. 1. (a) Pathotypes among 683 cases of enteric infection caused by diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC) in Brazil during the years of 2011–2016. (b) Occurrence of pathotypes in different age groups of patients affected by DEC strains in Brazil during the years of 2011–2016.

current results with studies conducted earlier in Brazil, two important differences were noticed: in prior years, EAEC strains were found to be more frequent than EPEC [10, 21], but presently, the occurrence of EPEC was higher than EAEC. In addition, according to previous reports, STEC and EIEC pathotypes were not found or were rarely diagnosed in cases of diarrhoea [10]. In this study, however, both pathotypes were found, albeit at lower frequencies compared with EPEC and EAEC. Our findings support the suggestion that there was a shift in the pattern of circulation of EAEC and EPEC strains in Brazil in recent years. Previously, EAEC were most common but EPEC have become predominant. However, the differences between the results of this study and earlier Brazilian studies may be due to the focus of earlier studies on specific regions and on children under 5 years of age [10]. So, the data they provided regarding the circulation of DEC pathotypes although useful could have been biased by local factors.

Figure 1b shows the age distribution for all DEC-positive samples collected from Brazilian patients ranging from 3 months to

96 years old. Most (370; 54%) of the DEC strains were isolated from individuals aged up to 5 years old. However, an analysis of the occurrence of the different pathotypes by age groups showed some differences regarding individual pathotypes. Most EPEC, EAEC and STEC strains were isolated from patients aged <5 years old, whereas most EIEC strains occurred among those aged >10 years old (22; 73%). ETEC infections occurred almost equally in children and adults, being found in 22 (51%) of cases involving children younger than 5 years old and in 21 (49%) cases of individuals older than 10. This pathotype did not occur in subjects older than 60. Statistical analyses demonstrated that DEC pathotypes were not equally distributed among the distinct age categories ($P < 0.001$), with the exception of ETEC, which was equally distributed between the two age groups from which this pathotype was isolated ($P > 0.05$). Enteric infections affecting young children may have serious negative consequences, so in most studies [1], including studies performed in Brazil [10, 21], this population is preferentially targeted. There is evidence that frequent and persistent infections due to DEC can lead to impairments in physical and cognitive development [25]. Moreover, age is a risk factor for HUS development after STEC infections, and children <5 years old are considered to be at greater risk [26]. The two laboratory-confirmed HUS cases in this study involved patients aged <5 years. Therefore, considering that infectious diarrhoea more often affects young children, and can also be more detrimental to them, we advise that this group of patients must receive priority for diagnosis and intervention measures.

All the identified EPEC strains of this study, except one, were classified as atypical (aEPEC), as they lacked *bfp* gene. The only typical (tEPEC) we found was a strain belonging to serotype O157:H39, isolated in 2011 from a child. Since the original description of EPEC in the middle of 1940s [27], tEPEC was the leading cause of childhood diarrhoea. However, in the 1990s, for undetermined reasons, a decline in the incidence of aEPEC [28, 29], which is nowadays by far more prevalent than tEPEC in many locations. This trend has also been observed in Brazil [29], however, care should be taken in analysing this phenomena, as previously the identification of EPEC was based solely in serogroup determination and the presence of *bfp* gene was not routinely sought. Atypical EPEC infections affect both children and adults, and have been linked to acute, persistent and outbreaks of diarrhoeal diseases in several countries, including Brazil [12].

Among the aEPEC strains of this study, 86 serogroups were identified and their association with distinct flagellar antigens resulted in 96 different serotypes. The diversity of serogroups and serotypes found among aEPEC strains in our study is shown in Table 2. As it can be noted, no predominant serotype was identified in the period analysed, although some specific ones like O126:H19 and O33:H34 were found more often than the others. Moreover, we also observed the presence of serotypes as O145:HNM, O55:H7, O63:H6 and O26:H11/HNM that are frequently associated with STEC pathotype, raising the speculation that these aEPEC could actually represent strains that were originally STEC before loss of *stx* genes, which are bacteriophage-borne [30]. There were serotypes such as O39:HNM that have already been linked with EPEC diarrhoeal outbreaks [31]. Serotype O2:H16 in particular has been reported as an agent of aEPEC outbreaks in Brazil [12]. The finding of a great diversity of serotypes among aEPEC in this study is in agreement with other studies [32], demonstrating the heterogeneous nature of aEPEC in terms

ETEC is a major cause of moderate-to-severe diarrhoea in developing countries especially in Asia [39]. This pathotype is also an important enteric pathogen in South America and earlier studies in Brazil have reported ETEC infections, including outbreaks, in different regions [10, 21, 40]. In the present study, ETEC was isolated in 43 (6.3%) of the total of diarrhoeal cases analysed. Our results confirm that although less frequent than other DEC pathotypes such as EPEC and EAEC, ETEC are still responsible for causing enteric illness in our country, and must therefore continue to be considered in the list of enteric pathogens to be sought for the diagnosis of diarrhoeal diseases. In this study, we found the profile *lt+/st+* as the most common toxigenic genotype among ETEC-positive isolates, being present in 56% (24/43) of these strains, while 44% (19/43) of the strains harboured only LT enterotoxin-related gene *lt*. None of the strains studied carried *st* gene alone. It has been reported that *st* or *st/lt* carrying ETEC strains, rather than *lt* only harbouring ETEC, are more often associated with moderate-to-severe diarrhoea and a higher risk of death in young children [1]. In the *st+* isolates, *st_h* gene variant was carried by 21 strains, while only one strain possessed the *st_p* variant. ST enterotoxin variants STh and STp can both induce diarrhoea in humans; however, the human variant is considered to be more relevant in clinical terms due to its higher prevalence when compared with STp [41]. Three ETEC strains did not give any result in relation to the *st* gene variants searched. No information regarding the toxigenic profiles of ETEC isolated previously in Brazil is available; therefore, our findings although derived from a small number of strains are the only data available on this topic. Examination of the 43 ETEC isolates for O:H antigens demonstrated the occurrence of 14 distinct serotypes (Table 2). However, 25 (58%) of these strains belonged to the single serotype O6:H16, including 22 motile strains (H16 antigens expressed) and three non-motile strains (H16 type was determined by PCR-RFPL analysis of *fliC* genes). ETEC of serotype O6:H16 is of worldwide occurrence, being one of the most common serotypes associated with ETEC infections in humans [2].

All the strains positive for *stx* genes in this study were phenotypically confirmed as STEC in Vero cell cytotoxic assays. We had 19 strains (65.5%) carrying *stx1*, while nine (31%) carried only *stx2* and one strain carried both *stx1* and *stx2* (Table 3). Previous studies characterizing STEC of clinical origin in Brazil have also reported that most of the isolates harboured only *stx1* and were from cases of acute non-complicated diarrhoea [42]. Subtyping of *stx* genes revealed that *stx1a* allele was carried by all the *stx1*-positive strains, except one that had *stx1d* (Table 3). In relation to *stx2* subtypes, we encountered the allele 2a in association with 2c, 2d or 2e in five of the *stx2*-positive STEC, while subtypes 2c and 2e were found alone in four strains (Table 3). Subtypes 2b and 2g were not present. *Stx2* and subtypes 2a, 2c and 2d are more often linked with complicated STEC infections and their association with some specific O serogroups and adherence factors can be a predictor of greater probability of HUS [43–45]. In this study, we were able to demonstrate that these three most problematic *stx2* subtypes were found in most of *stx2*-positive strains. However, STEC strains producing Stx1 can also cause HUS [45], so the possibility that *stx1a*-bearing Brazilian isolates can be responsible for more complicated infections exist and for this reason they must be carefully monitored.

Twenty (69%) of the STEC strains herein analysed possessed *eae* gene, while nine strains (31%) lacked this marker (Table 3). This indicates that the majority of the human STEC infections in Brazil, in the period covering this study, were caused by strains

dotted with the potential ability to express both Shiga toxin and A/E phenotypes. The potential to form A/E lesions by STEC isolates is regarded as an additional risk factor in the clinical outcome of STEC diseases, as there is a higher risk of HUS development [9]. In fact, most of the HUS cases registered in Brazil [46] including the two cases analysed in this study were caused by strains carrying *stx2* and *eae*. In this study, STEC strains fell into 15 distinct serotypes (Table 2), and included serotypes of major epidemiological importance such as O157:H7, O111:H8/NM, O26:H11, O145:HNM, O103:HNM, as well as serotypes which have been implicated in human disease, but isolated less frequently [47]. The most frequent serotype presently observed was O111:H8. The same situation was observed in prior years in Brazil where STEC O111 was the most frequent serogroup encountered in human diseases [42]. By comparing the present results with data about STEC serotypes in Brazil spanning the period of 1979–2004, we could note that the diversity of serotypes detected in this study was greater than that observed before. This may be indicative of the efforts that have been made in Brazil to increase the detection of STEC pathogens by employing molecular approaches targeting *stx* genes, instead of serogroup-based screening by immunological methods, which were largely performed in the past. This change in methodology must continue and should be implemented in the largest possible number of laboratories in Brazil, for the benefit of future surveys addressing STEC infection epidemiology.

Studies describing the occurrence and markers for EIEC circulation are scarce. This is due to the fact that EIEC differentiation from *Shigella* is often problematic as these two bacteria are closely related and almost identical in terms of genetic contents. Additionally, surface antigens of EIEC and *Shigella* cross-react, so serological tests may not be a suitable option. In fact, there is evidence from phylogenetic studies demonstrating that EIEC strains represent intermediate forms in the evolution from commensal *E. coli* to *Shigella* [48]. Differentiation among EIEC and *Shigella* is possible only through extensive biochemical profiling which can be performed solely in reference laboratories. As a consequence, EIEC strains are under-represented in most epidemiological surveys. Therefore, EIEC contribution to the burden of DEC infections is largely overlooked. In this study, phenotypically confirmed EIEC corresponded to 4.4% of DEC strains, showing that this pathotype has a role in community-acquired diarrhoea in Brazil. Serogroups O132, O121 and O124 were the most common, being present in 9/30 (30%), 7/30 (23%) and 6/30 (20%) of strains, respectively, and serotype O132:H21 was the most frequent. Serogroups O121 and O124 are among the most commonly reported among EIEC strains [2], and in this sense, our results only partially agree with previous reports, as in this study the O132 serogroup was the most prevalent. EIEC outbreaks have been reported in other countries [49] and we are currently performing PFGE typing to assess the genetic relatedness among strains of the same serotype isolated in this study.

Ten of the *eae*-harbouring strains, which had been previously identified in our routine laboratory testing as EPEC, were actually found to be *E. albertii*. The recognition of *E. albertii* is challenging in that with few exceptions their biochemical profile and most of the virulence markers resemble DEC pathotypes EPEC and STEC. Only recently genomic approaches have allowed accurate discrimination, reallocating these strains to another taxonomic position [50]. This is the first report on the occurrence of *E. albertii* from active surveillance of foodborne diseases in Brazil. The majority of the *E. albertii* were untypeable or rough regarding

Table 3. Serotypes and *stx* genotypes among 29 STEC strains recovered from human infections in Brazil from 2011 to 2016

Strain	Year of isolation	Serotype	<i>stx</i> genotype	Presence of <i>eae</i>	Clinical condition	
179/11	2011	OR:HNM	2c	+	AD	
61/12	2012	O100:HNM	2e	–	AD	
75/12		O111:HNM	1a,2a	+	AD	
169/12		O177:HNM	2c	+	AD	
343/12		O153:H21	1a	–	AD	
359/12		O111:H8	1a	+	AD	
611/12		O111:HNM	1a	+	AD	
340/13		2013	O157:H7	2a,2c	+	HUS
377/13			O24:H4	1a	–	AD
423/13			O118:H16	1a	+	AD
444/13			O103:HNM	1a	+	AD
502/13	O111:H8		1a	+	AD	
605/13	O71:H8		1a	+	AD	
438/14	2014		O111:H11	1a	+	AD
504/14			O145:HNM	1a	+	AD
544/14		O153:H7	1d	–	AD	
579/14		O123:HNM	1a	+	AD	
589/14		O91:H14	1a	–	AD	
672/14		O8:H19	2a,2d	–	AD	
P059-9/14		O26:H11	1a	+	BD	
302/15		2015	ONT:H46	2a,2d	–	AD
516/15			O123:H2	1a	+	AD
768/15			O111:HNM	1a	+	AD
831/15	O157:H7		2a,2c	+	HUS	
927/15	O123:HNM		1a	+	AD	
P001/15	ONT:H19		2a, 2e	–	AD	
254/16	2016		O123:HNM	1a	+	AD
583/16		O178:H19	2c	–	AD	
811/16		O111:HNM	1a	+	AD	

AD, acute diarrhoea; BD, bloody diarrhoea; HUS, haemolytic uremic syndrome.

their somatic antigens, and were non-motile, so their O:H serotypes could not be identified. This is in agreement with previous reports of the antigenic untypeability of *E. albertii* strains [51]. It is worth mentioning that there is no specific typing scheme for *E. albertii* and attempts to determine their somatic and flagellar antigens usually employ antisera produced against *E. coli* strains. This suggests that *E. albertii* O and H antigens may have distinct characteristics in relation to *E. coli* antigens. However, there were two exceptions in this study, as two strains reacted with O113 *E. coli* antisera, but were non-motile, rendering serotype O113:HNM. One of the analysed *E. albertii* strains in this study was positive for *stx2f* gene. Production of Stx2f by *E. albertii* strains has been reported [7] and one can speculate about the potential of these strains to cause more serious diseases. So far, *E. albertii* appears to represent a small proportion of the diarrhoeagenic strains circulating in Brazilian settings, but even so they must receive attention in surveillance programmes in Brazil and

elsewhere, so that it will be possible to determine how their circulation trends will evolve.

We attempted to draw a scenario for DEC strains occurrence in comparison to prior years in Brazil, and with data from other countries. Although several problems were faced, especially related to logistical difficulties in sending bacterial isolates to reference laboratories for analysis, we believe the present study contributes a useful 'snapshot' on the aetiology of diarrhoeal diseases caused by DEC strains in our country. Certainly this will be very important for future studies and considering intervention measures. The continuous epidemiological surveillance of food and water transmissible diseases and characterization of DEC strains associated with human infections is essential for the recognition of new patterns of pathogen virulence and circulation. In this regard, it is of paramount importance that public health and clinical laboratories involved in infectious diseases diagnosis and surveillance are capable of correctly recognizing DEC strains.

Acknowledgements. The authors are grateful to Professor J. C. F. Pantoja for assistance with statistical analysis. The authors also acknowledge the work of all the professionals of the State Public Health Laboratories in Brazil involved in the laboratory surveillance of enteric diseases.

Conflict of interest. None.

References

- Kotloff KL et al. (2013) Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (The Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet* **382**, 209–222.
- Croxen MA et al. (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* **26**, 822–880.
- Estrada-Garcia T and Navarro-Garcia F (2012) Enterotoxigenic *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging food-borne enteropathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **66**, 281–298.
- Hernandes RT et al. (2009) An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **297**, 137–149.
- Parsot C (2005) *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiology Letters* **252**, 11–18.
- Hyma KE et al. (2005) Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. *Journal of Bacteriology* **187**, 619–628.
- Ooka T et al. (2012) Clinical significance of *Escherichia albertii*. *Emerging Infectious Diseases* **18**, 488–492.
- Platts-Mills JA et al. (2015) Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *The Lancet Global Health* **3**, 564–575.
- Paton JC and Paton AW (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews* **11**, 450–479.
- Moreno ACR et al. (2010) Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **66**, 50–57.
- Bielaszewska M et al. (2007) Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* **297**, 625–639.
- Vieira MA et al. (2016) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as etiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhea in Brazil. *Journal of Medical Microbiology* **65**, 998–1006.
- Peresi JTM et al. (2016) Search for diarrheagenic *Escherichia coli* in raw kibbe samples reveals the presence of Shiga toxin-producing strains. *Food Control* **63**, 165–170.
- Elias WP et al. (2002) Combinations of putative virulence markers in typical and variant enterotoxigenic *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. *Epidemiology and Infection* **129**, 49–55.
- Rodas C et al. (2009) Development of multiplex PCR assays for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors and toxins. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 1218–1220.
- Lindsey RL et al. (2017) Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*. *Journal of Microbiological Methods* **140**, 1–4.
- Scheutz F et al. (2012) Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* **50**, 2951–2963.
- Ewing WH (1986) *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, 4th Edn. New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc., 536 pp.
- Machado J, Grimont F and Grimont PAD (2000) Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Research in Microbiology* **151**, 535–546.
- Konowalchuk J, Speirs JI and Stavric S (1977) Vero response to a cyto-toxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **18**, 775–779.
- Bueris V et al. (2007) Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **102**, 839–844.
- Huang Z et al. (2016) Prevalence and antimicrobial resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* in Shanghai, China. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **35**, 1.
- Ifeanyi CIC et al. (2015) Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. *Journal of Infection in Developing Countries* **9**, 165–174.
- Canizalez-Roman A et al. (2016) Surveillance of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrhea cases from children, adults and elderly at northwest of Mexico. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1924.
- Guerrant RL et al. (2008) Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutrition Reviews* **66**, 487–505.
- Proulx F, Seidman EG and Karpman D (2001) Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Research* **50**, 163–171.
- Bray J (1945) Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bacterium coli neopolitanum* from summer diarrhea of infants. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **57**, 239–247.
- Ochoa TJ et al. (2008) New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**, 852–856.
- Rodrigues J et al. (2004) Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 398–400.
- Bielaszewska M et al. (2007) Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS ONE* **2**, e1024.
- Hedberg CW et al. (1997) An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *The Journal of Infectious Diseases* **176**, 1625–1628.
- Tennant SM et al. (2009) Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC Microbiology* **9**, 117.
- Cennimo D et al. (2009) The prevalence and virulence characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* at an urgent care clinic in the USA: a case-control study. *Journal of Medical Microbiology* **58**, 403–407.
- Itoh Y et al. (1997) Laboratory investigation of enterotoxigenic *Escherichia coli* O Untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2546–2550.
- Weintraub A (2007) Enterotoxigenic *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *Journal of Medical Microbiology* **56**, 4–8.
- Jenkins C et al. (2006) Genotyping of enterotoxigenic *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **55**, 13–19.
- Regua-Mangia AH et al. (2009) Molecular typing and virulence of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. *Journal of Medical Microbiology* **58**, 414–422.
- Uber AP et al. (2006) Enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. *FEMS Microbiology Letters* **256**, 251–257.
- Qadri F et al. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology Reviews* **18**, 465–483.
- Vicente ACP et al. (2005) Outbreaks of cholera-like diarrhoea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Brazilian Amazon rainforest. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **99**, 669–674.
- Fleckenstein JM et al. (2010) Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection* **12**, 89–98.
- Vaz TMI et al. (2004) Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 903–905.
- Usein C-R et al. (2017) Molecular characterisation of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains: results of an outbreak investigation, Romania, February to August 2016. *Euro Surveillance* **22**, 00148.

44. **Bielaszewska M et al.** (2006) Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clinical Infectious Diseases* **43**, 1160–1167.
45. **Zhang W et al.** (2007) Structural and functional differences between disease-associated genes of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O111. *International Journal of Medical Microbiology* **297**, 17–26.
46. **Souza RL et al.** (2011) Hemolytic uremic syndrome in pediatric intensive care units in São Paulo, Brazil. *The Open Microbiology Journal* **5**, 76–82.
47. **Saupe A et al.** (2017) Acute diarrhoea due to a Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* O8:H19. *Journal of Medical Microbiology Case Reports* **4**, 4–6.
48. **Peng J, Yang J and Jin Q** (2009) The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infection, Genetics and Evolution* **9**, 147–152.
49. **Newitt S et al.** (2016) Two linked enteroinvasive *Escherichia coli* outbreaks, Nottingham, UK, June 2014. *Emerging Infectious Diseases* **22**, 1178–1184.
50. **Ooka T et al.** (2015) Defining the genome features of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*. *Genome Biology and Evolution* **7**, 3170–3179.
51. **Nimri LF** (2013) *Escherichia albertii*, a newly emerging enteric pathogen with poorly defined properties. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **77**, 91–95.