UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) ISOLADAS DE ANIMAIS E HUMANOS

Lívia Gerbasi Beraldo
Biomédica

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) ISOLADAS DE ANIMAIS E HUMANOS

Lívia Gerbasi Beraldo

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila

Tese apresentada á Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

2015

Beraldo, Livia Gerbasi
B482a Análise molecular de estirpes de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) isoladas de animais e humanos / Livia Gerbasi Beraldo. – – Jaboticabal, 2015
xi, 63 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Fernando Antonio de Avila
Banca examinadora: Hélio José Montassier, José Moacir Marin, Ariel Eurides Stella, Oliveiro Caetano de Freitas Neto
Bibliografia

1. EPEC. 2. Genes de virulência. 3. PFGE. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.91

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE MOLECULAR DE ESTIRPES DE Escherichia coli ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) ISOLADAS DE ANIMAIS E HUMANOS

AUTORA: LIVIA GERBASI BERALDO

ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN
Ciências Morfológicas / Faculdade de Odontologia / Usp / Universidade de São Paulo

Prof. Dr. ARIEL EURIDES STELLA
Universidade Federal de Goiás / Jataí/GO

Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO
Universidade Federal da Paraíba / Areia/PB

Data da realização: 28 de janeiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LÍVIA GERBASI BERALDO - nascida a 21 de maio de 1986 em Jaboticabal-SP. Concluiu o Segundo Grau na Escola Estadual Aurélio Arrôbas Martins em 2003. Iniciou o curso de Biomedicina, no ano de 2005, no Centro Universitário de Araraquara, concluindo em janeiro de 2009. Em março de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, concluindo em fevereiro de 2011. Em março de 2011 iniciou o curso de doutorado no mesmo Programa.

Dedico,

à Deus, que está acima de todas as coisas,

a meus queridos pais Izabel e Sérgio e minha irmã querida Aline que sempre me incentivaram a seguir em frente, dando força e auxiliando sempre, dando todo carinho e suporte para que eu chegasse até aqui.

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me ter dado força, saúde, iluminado o meu caminho e das pessoas que eu amo que estão ao meu redor, durante todo esse tempo.

Agradeço meus pais Sérgio Aparecido Beraldo e Izabel Cristina Gerbasi Beraldo, minha querida irmã Aline Gerbasi Beraldo pelo incentivo, confiança e apoio durante todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila, não só pela orientação e ensino, mas também pelo imenso apoio e confiança.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Veterinária, Clarissa Araújo Borges, Marita Vedovelli Cardozo e Renato P. Maluta pelo auxílio e companheirismo em todos os momentos.

Ao técnico do Laboratório de Microbiologia Veterinária, João L. Quintana, e a secretária do departamento de Microbiologia Edna M. T. Daquila pelo auxílio em todos os momentos.

Agradeço também a CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
3. OBJETIVOS.....	09
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
5. RESULTADOS.....	17
6. DISCUSSÃO.....	26
7. CONCLUSÕES.....	33
8. REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

^{0}C – Graus Celsius

BFP- Fator de aderência denominado “Bundle forming pili”

EAF - Plasmídeo de EPEC típica

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

LEE - *Locus of enterocyte effacement*

µL - Microlitro

mL - Mililitro

mM - Milimolar

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

SHU - Síndrome hemolítica urêmica

TEB - Solução tampão Tris-EDTA-Borato

UV - Ultra-violeta

V - Volt

LISTA DE TABELAS

1. Iniciadores utilizados para amplificar genes de virulência em isolados de EPEC..... 12

2 Perfil dos genes de virulência das estirpes de EPEC isoladas de humanos e animais..... 18

3- Perfil dos genes de virulência, sorotipagem, e subtipagem do gene *eae* das estirpes de EPEC isoladas de humanos e animais 19

4- Teste de sensibilidade aos antimicrobianos das estirpes de EPEC isoladas de animais e humanos 23

LISTA DE FIGURAS

1- Fluxograma indicando os procedimentos adotados para se obter os isolados de EPEC..... 11

2- Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de cepas de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR dos genes Chua, yjaA e TSPE4..... 15

3- Dendrograma mostrando relação de similaridade estabelecida por PFGE utilizando-se o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA..... 22

ANÁLISE MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) ISOLADAS DE ANIMAIS E HUMANOS.

RESUMO - *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é uma categoria de *E. coli* de interesse em saúde pública, pois é responsável por causar diarréia, principalmente em crianças de países em desenvolvimento. Um total de 68 estirpes EPEC isoladas de humanos e animais (búfalos, ovinos e suínos) foram analisadas para marcadores de virulência e submetidos à sorotipagem, subtipagem do gene *eae* e similaridade clonal por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Os resultados da PCR demonstraram que seis isolados de humanos possuíam o gene *bfp* (EPEC típica), enquanto que 62 estirpes possuíam apenas o gene *eae* (EPEC atípica). Essas estirpes de EPEC pertenciam a 39 sorotipos (O: H) incluindo sorotipos clássicos de EPEC que estão relacionados a doenças em humanos, como O26:H11, O128:H2 e outros sorotipos relacionados a pessoas com diarreia, como O8:H16 e O76:H7. Seis tipos de intimina foram detectados entre as 68 estirpes de EPEC. São elas a β1, β2, γ1, ζ, κ e o. A análise do PFGE, após a digestão Xbal, foi realizada nas 68 estirpes de EPEC. Os isolados se mostraram heterogêneos no PFGE e apresentaram 55 perfis diferentes. Quanto a filogenia, a maioria das estirpes de EPEC foram classificadas dentro do grupo B1. Além disso, algumas estirpes foram classificadas no grupo D, que são constituídos por estirpes de *E. coli* que podem causar infecções extra-intestinais. A presença de tipos de EPEC potencialmente patogênicas para humanos e EPEC isoladas de animais com características genéticas e fenotípicas em comum indica que a transmissão de agentes zoonoticos pode ocorrer. Portanto, o papel destes animais como reservatórios de EPEC deve ser considerado nas investigações de surtos de diarreia.

Palavras-chave: EPEC, genes de virulência, PFGE, zoonose.

ANÁLISE MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) ISOLADAS DE ANIMAIS E HUMANOS.

ABSTRACT - *Escherichia coli* (EPEC) is a category of *E. coli* in interest in public health, as it is responsible for causing diarrhea, especially in children in developing countries. A total of 68 strains of EPEC isolated from humans and animals (buffalo, sheep and pigs) were analyzed for virulence markers, serotyping, subtyping of the *eae* gene and similarity clonal by electrophoresis in pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The PCR results showed that six human isolates had the *bfp* gene (typical EPEC), and 62 strains only had the *eae* gene (atypical EPEC). These strains belonged to 39 EPEC O: H serotypes including classical EPEC that are related to diseases in humans, such as O26: H11, O128: H2 and other serotypes that were related to people with diarrhea, as O8: H16 and O76:H7. Six types of intimin were detected among the 68 strains of EPEC, and β1, β2, γ1, ζ, κ and o. The PFGE analysis, after XbaI digestion was performed on 68 strains of EPEC. The isolates were shown in heterogeneous PFGE and had 55 different profiles. Regarding the Phylogeny most strains of EPEC were classified into the group B1. Furthermore, some strains have been classified in group D, which consist of the *E. coli* strains that cause extra-intestinal infections. The presence of potentially pathogenic for humans types of EPEC and EPEC strains isolated from animals that may indicate disease transmission between animals and humans can occur and have an impact on public health. Furthermore, the role of these animals as EPEC carriers should be considered in outbreak investigations diarrhea.

Keywords: EPEC, virulence genes, PFGE, zoonosis.

1.INTRODUÇÃO

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é uma categoria de *E. coli* que pode causar diarréia severa, principalmente em crianças de países em desenvolvimento. EPEC podem ser definidas pela presença do gene *eae*, o qual codifica uma proteína denominada intimina, que é requerida para a adesão a mucosa intestinal, produzindo uma lesão do tipo “attaching and effacing” (A/E). Essa lesão é iniciada pela adesão da bactéria nos enterócitos, levando a perda das microvilosidades intestinais. A intimina é altamente variável entre os diferentes sorotipos de EPEC e algumas variantes antigênicas distintas têm sido identificadas, como α, β, γ, δ, ε, ι, κ, η, ζ, entre outras. EPEC podem ser classificadas em típicas e atípicas. Linhagens que possuem o plasmídeo EAF são chamadas de EPEC típicas (tEPEC) e as que não possuem este plasmídeo são chamadas de EPEC atípicas (aEPEC). O gene *bfp* contido no plasmídeo EAF codifica um fator de adesão denominado “Bundle-forming pili” (BFP), sendo que o plasmídio EAF também possui genes necessários para a expressão da intimina.

Algumas estirpes de *E. coli* patogênicas para humanos fazem parte da microbiota intestinal de varias espécies animais, como ovinos, bubalinos, bovinos, suínos, cães, gatos, entre outros. Recentemente algumas cepas de aEPEC com certos genes de virulência foram associadas à diarréia em humanos (*nle*B e *nle*E). A possibilidade de animais servirem como reservatório de EPEC com potencial zoonótico necessita ser melhor investigado.

Diante do exposto, devido aos possíveis riscos acarretados à saúde pública por linhagens de EPEC, são necessários estudos que avaliem a distribuição e frequência dessas estirpes nos animais, possibilitando a comparação com estirpes de EPEC isoladas de humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Escherichia coli é uma das mais conhecidas e mais bem caracterizados espécies bacterianas; pertence ao gênero *Escherichia*, que contém a maioria dos bacilos móveis Gram negativos da família *Enterobacteriaceae* (NATARO; KAPER, 1998). *E. coli* é um microrganismo que coloniza o trato intestinal onde, tanto o hospedeiro como a bactéria obtém benefícios mútuos, como a fabricação de vitamina K e B. Essa bactéria permanece confinada na luz do intestino grosso. No entanto, a quebra de alguma barreira gastrintestinal ou imunossupressão as estirpes de *E. coli* podem causar infecção (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

E. coli pertence a um grupo geneticamente heterogêneo no qual seus membros são geralmente não patogênicos (GYLES, 2007). Existem algumas estirpes de *E. coli* que adquiriram certas características de virulência, tornando-as mais aptas a se adaptar a novos nichos, e causar uma variedade de enfermidades (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), tornando-se assim patogênicos.

Estirpes de *E. coli* associadas com o hospedeiro humano podem ser classificadas como comensais, patógenos entéricos (*E. coli* diarreiogênicas - DEC) ou patógeno extra-intestinal, de acordo com o seu conjunto de genes de virulência e propriedades clínicas (RUSSO; JOHNSON, 2000; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Os últimos agentes patogênicos compreendem várias cepas, que podem causar infecções em seres humanos e / ou animais (RUSSO; JOHNSON, 2000).

As *E. coli* diarreiogênicas são divididas em seis categorias: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enteroagregativa (EAEC), difusamente adrente (DAEC) e produtora de toxina Shiga (STEC). Cada categoria utiliza diferentes fatores de virulência para causar infecção em humanos, consequência de um variado repertório gênico proporcionado principalmente por: (1) plasmídios de virulência, (2) ilhas de patogenicidade e (3) profagos (PATON; PATON, 1998). EPEC, EHEC e ETEC também podem causar doenças em animais, usando fatores de virulência

presentes em estirpes isoladas de humanos, além de outros (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Os primeiros surtos de diarréia causados por EPEC foram descritos por Bray no Reino Unido em 1945. Este pesquisador identificou grupos de *E. coli*, sorologicamente distintos, que eram isolados de crianças com diarréia, mas não de crianças saudáveis. Após este estudo, diversos surtos de diarréia, com altas taxas de mortalidade, foram descritos em países desenvolvidos até o final dos anos 50 (ROWE, 1979; LEVINE; EDELMAN, 1984). Devido aos frequentes surtos de *E. coli* registrados naquela época, alguns autores criaram o termo EPEC para definir as amostras *E. coli* que causavam estes surtos. Atualmente, surtos causados por EPEC são raros em países desenvolvidos. No entanto, estas bactérias ainda representam um importante agente diarreiogênico em países em desenvolvimento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; OCHOA et al., 2008).

Estudos recentes baseados em métodos moleculares estimam que estirpes de EPEC seriam responsáveis por 10 - 20% de todos os casos de diarréia em crianças que vivem em países como Brasil, Chile e México (SCALETSKY et al., 2002; VIDAL et al., 2005; ARAUJO et al., 2007; OCHOA et al., 2008; ESTRADA-GARCIA et al., 2009).

Os diferentes patótipos de *E. coli* tendem a constituir grupos clonais que são caracterizados por partilhar os açucares dos lipopolissacáridos (LPS) O e os antígenos flagelares H, que definem sorogrupos (antígeno O) ou sorotipos (antígenos O e H) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Até o momento, já foram identificados pelo menos 180 antígenos O e 60 antígenos H, os quais são determinados por meio de técnicas de soroagluitinação (ØRSKOV, 1984; ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002).

Segundo a organização mundial de saúde (OMS) os principais sorogrupos de EPEC, também conhecidos como sorogrupos clássicos de EPEC, são o: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158. Trabulsi, Keller e Gomes (2002) verificaram diferentes aspectos genotípicos e fenotípicos das EPEC, concluindo que estirpes típicas e atípicas constituem dois grupos, representados por diferentes sorotipos. As EPEC típicas pertenceriam aos sorotipos: O55:H[6], O86:H34, O111:H[2], O114:H2,

O119:H[6], O127:H6, O142:H6 e O142:H34. Enquanto que as EPEC atípicas aos sorotipos O26:H[11], O55:H[7], O55:H[34], O86:H[8], O111:H[8], O111:H[9], O111:H25, O119:H2, O125:H6 e O128:H2.

Atualmente, além de estirpes de EPEC pertencentes aos sorogrupos clássicos, amostras de EPEC atípicas pertencentes a sorogrupos diferentes, denominados não clássico, têm sido isoladas (KRAUSE et al., 2005; BLANCO et al., 2006b; ARAUJO et al., 2007; HERNANDES et al., 2009).

Independentemente dos sorogrupos ou sorotipos a que pertençam as amostras estudadas, é difícil relacionar sorotipos com patótipos de DEC. Esta dificuldade reside principalmente no fato de algumas amostras de diferentes patótipos possuírem sorotipos idênticos.

Amostras do sorotipo O26:H[11], por exemplo, podem ser EPEC ou STEC, dependendo da presença ou ausência de fatores de virulência que caracterizam cada um destes patótipos (LEOMIL et al., 2005). Desta forma, a classificação de uma amostra como EPEC, ou como outro patótipo de ECD, deve ser baseada na detecção molecular e fenotípica de seus marcadores de virulência, sendo estas estirpes pertencentes ou não a sorogrupos clássicos.

EPEC são definidas pela presença do gene *eae*, que codifica a intimina requerida para o ataque a mucosa intestinal produzindo uma lesão do tipo “attaching and effacing” (A/E). O mecanismo central da lesão A/E é a destruição microvilosidades, a adesão da bactéria ao epitélio intestinal, formação do pedestal de actina e outros elementos do citoesqueleto nos locais de fixação bacteriana (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

EPEC além de promover a destruição das microvilosidades intestinais, podem também expressar um fator de aderência denominado “Bundle-forming pili” (BFP) através do gene *bfp* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Linhagens que possuem o plasmídio EAF são chamadas de EPEC típicas (tEPEC) e as que não possuem este plasmídeo são chamadas de EPEC atípicas (aEPEC). O plasmídeo EAF codifica um fator de aderência localizado denominado “Bundle-forming pili” (BFP), bem como possui genes importantes para a expressão da intimina (NATARO; KAPER, 1998).

Estirpes de EPEC atípicas pertencem a um grupo diarreiogênico que vem aumentando no Brasil nos últimos anos (FRANZOLIN et al., 2005; BUERIS et al., 2007). Em algumas regiões do país, estas bactérias parecem ter

substituído as EPEC típicas, tornando-se principal agente diarreiogênico. Isso indica que no Brasil, assim como ocorreu em países desenvolvidos, está havendo mudança no perfil epidemiológico das EPEC, de típicas para atípicas (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; AFSET et al., 2003; FRANZOLIN et al., 2005; BUERIS et al., 2007; HERNANDES et al., 2009).

A virulência das EPEC típica e atípica está relacionada, principalmente, a sua capacidade de aderir à superfície de enterócitos e induzir vias de sinalização que resultam no surgimento de lesões intestinais (A/E). Estas lesões, inicialmente reduzem a capacidade de absorção dos intestinos, resultando em quadro de diarréia (NATARO; KAPER, 1998).

Os fatores necessários para o desenvolvimento da lesão A/E são codificados por uma ilha de patogênicidade cromossômica de aproximadamente 35 Kb, e é conhecida como *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE). A região LEE das EPEC possui 41 *Open Reading Frames* (ORFS) organizadas em cinco grandes operons, LEE1 – LEE5 (CLARKE, 2001).

Nos operons LEE1, LEE2 e LEE3 estão presentes genes *esc* (*E. coli secretion*), responsáveis pela expressão do sistema de secreção do tipo III (T3SS) das EPEC e EHEC. A função deste sistema é translocar proteínas do citoplasma bacteriano diretamente para o citoplasma da célula hospedeira (JARVIS et al., 1995; KENNY; FINLAY, 1995).

No operon LEE4 estão presentes os genes *esp* (*E. coli secreted protein*), *sepL,* entre outros. Os produtos destes genes exercem diferentes funções que auxiliam no desenvolvimento das lesões A/E. No operon LEE5 estão presentes os genes *eae* (*E. coli attaching and effacing*) e *tir* (*translocated intimin receptor),* codificadores da proteína de membrana externa (OMP), intimina e seu receptor Tir, respectivamente (KENNY; FINLAY, 1995; KENNY et al., 1997; CLEARY et al., 2004; KAPER et al., 2004).

Com relação às características estruturais dos genes presentes na região LEE, observa-se que aqueles presentes em LEE4 e LEE5 apresentam sequências variáveis, permitindo a identificação de diferentes subtipos (CHINA et al., 1999; HERNANDES et al., 2009).

EspA, codificada pelo gene *espA*, é uma proteína filamentosa responsável pela adesão inicial das EPEC e formação de um tubo de translocação na superfície bacteriana. Esta estrutura quando em contato com

os enterócitos possui a função de translocar outras proteínas codificadas pela região LEE, bem como outras proteínas codificadas por genes de outras regiões do genoma (FRANKEL et al., 1998; CLEARY et al., 2004; HERNANDES et al., 2009).

Dentre as proteínas translocadas podemos citar EspB (codificada pelo gene *espB*) e EspD (codificada pelo gene *espD*) que agem sobre a membrana plasmática da célula eucariota, levando a formação de um poro. Este poro permite a passagem dos efetores Tir, Esps, entre outras proteínas diretamente para o citoplasma da célula eucariótica (CREASEY et al., 2003; CLEARY et al., 2004).

As proteínas translocadas possuem diferentes funções como desestruturação do citoesqueleto (EspB), perda da resistência transepitelial e inibição da fagocitose (EspF), desregulação da função mitocondrial (Map), entre outras (NATARO; KAPER, 1998). As funções de Tir compreendem a autoinserção na membrana da célula eucariota, servindo de receptor para a intimina, e a indução da polimerização de componentes do citoesqueleto eucarioto, induzindo ao desenvolvimento do pedestal na superfície do enterócito (KENNY, 1999; KENNY; WARAWA, 2001).

A intimina é uma proteína de 94KDa, cuja função é se ligar ao receptor Tir e induzir a formação do pedestal característico das lesões A/E (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A porção N-terminal desta proteína é altamente conservada, enquanto sua porção C-terminal é variável, permitindo a identificação de diferentes subtipos (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000; JENKINS et al., 2003). A presença de diferentes subtipos de intimina se deve provavelmente, ao fato deste gene sofrer intensa pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Atualmente algumas variantes antigênicas distintas têm sido identificadas. Dentre os quais estão α1, α2, β1, β2, γ1, γ2/θ, δ/κ, ε, ι, λ, η, ζ, μ, ν (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000; TARR; ZHANG et al., 2002; JORES et al., 2003; NIELSEN; ANDERSEN, 2003; BLANCO et al., 2004).

No que se diz respeito a outros fatores de virulência, segundo Trabulsi, Keller e Gomes (2002), as EPEC típicas são mais homogêneas em seu perfil de virulência que as EPEC atípicas. Com poucas exceções, cepas típicas expressam apenas os fatores de virulência contidos na região LEE e no pEAF.

Em contraste, as EPEC atípicas frequentemente expressam fatores de virulência presentes em outras regiões, como *Enteroaggregative E. coli Heat-Stable Enterotoxin* (EAST-1), Enterohemolisina (E-hlyA), adesina Afa, entre outros (LEOMIL et al., 2005; BIELASZEWSKA et al., 2007; HERNANDES et al., 2009). Desta forma, existem dois tipos de EPEC atípica aquelas que expressam apenas fatores de virulência codificados pela região LEE, as que expressam fatores de virulência codificados por essa região e por outras regiões do genoma.

Fatores de virulência de EPEC adicionais que são codificados fora da região LEE (non LEE) também têm sido descritos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004) porem a função de muitos destes efetores ainda não foram definidas.

O gene *nle*A é conhecido por inibir a secreção de proteínas (THANABALASURIAR et al. 2009) enquanto *nle*E e *nle*H ativa a resposta imune inata (HEMRAJANI et al., 2010; NEWTON et al., 2010). Alguns estudos sugerem que efetores como NleB, NleE, NleF e NleH desempenham papel na colonização e virulência bacteriana, enquanto que o NleC e NleD ainda não possuem função definida (CROXEN; FINLAY, 2010). Além disso alguns desses efetores non LEE foram estatisticamente associados a diarreia em humanos, como *nle*B e *nle*E (AFSET et al., 2006).

Estirpes de EPEC típicas raramente são isoladas de animais, sendo o homem sua principal fonte de infecção (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; CARVALHO et al., 2003; NAKAZATO et al., 2004). Em contraste, estirpes de EPEC atípica são isoladas de humanos e animais, com ou sem diarréia, em frequências equivalentes, não permitindo definir uma fonte de infecção para estas bactérias (BEUTIN et al., 2003; CARVALHO et al., 2003; NAKAZATO et al., 2004; AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007).

Estudos associam animais de criação, de estimação e alguns silvestres como possíveis reservatórios e possíveis fonte de infecção de EPEC atípica para humanos (CARVALHO et al., 2003; NAKAZATO et al., 2004; KRAUSE et al., 2005; ISHII et al., 2007).

Estudos com EPEC atípica têm focado principalmente na comparação entre estirpes isoladas de casos de diarreia com cepas isoladas de pacientes

saudáveis (AFSET et al., 2008). Portanto, há necessidade de estudos que esclareçam as relações genéticas existentes entre amostras de EPEC isoladas de humanos e animais. Diante do exposto o presente estudo foi elaborado e tem como objetivo comparar amostras de EPEC isoladas de animais e humanos por PFGE, sorologia, entre outras análises.

3. OBJETIVOS

3.1. Determinar a frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) em amostras provenientes de culturas de fezes humanas.

3.2. Determinar a presença de genes relacionados a região LEE e não LEE de EPEC em isolados de búfalos, suínos, ovinos e humanos, a fim de averiguar se isolados de animais e humanos compartilham os mesmos genes de virulência.

3.3. Realizar a subtipagem do gene *eae* nas estirpes de EPEC isoladas.

3.4. Determinar o agrupamento filogenético dos isolados de EPEC por PCR para os genes *chu*A, *yja*A e TspE4C2.

3.5. Determinar a frequência dos sorotipos das estirpes de EPEC isoladas.

3.6. Determinar o perfil de suscetibilidade das estirpes de EPEC isoladas de animais e de humanos, frente a diversas drogas antimicrobianas.

3.7. Estabelecer relação epidemiológica dos isolados de EPEC por PFGE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolados de EPEC

As estirpes de aEPEC de animais utilizadas nesse trabalho faziam parte da coleção do laboratório de bacteriologia da FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP, e foram isoladas de amostras de fezes de búfalos (12 estirpes), de suínos (15 estirpes) e de ovinos (15 estirpes). Além disso, foram analisadas culturas de *Escherichia coli* isoladas de fezes humanas, em placas contendo agar MacConkey (MC).

4.2.Triagem da presença do gene *eae* e confirmação de EPEC em estirpes humanos

Foram amostradas 396 culturas de fezes em placas contendo agar MC, cedidas pelos laboratórios clínicos do hospital de clínicas da USP de Ribeirão Preto – SP, e da cidade de Jaboticabal-SP, Brasil. Para o preparo do DNA molde uma alçada do crescimento confluente proveniente do cultivo das placas de agar McConkey foi transferida para um tubo contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, Reino Unido), o qual foi incubado a 37°C por 18 horas. O DNA foi extraído através da lise térmica. Esse DNA foi usado para a realização de uma PCR para o gene *eae* que determina o patótipo EPEC. A preparação do DNA molde assim como os procedimentos de PCR e respectivos iniciadores utilizados foram feitos de acordo com o protocolo do EcL disponível em http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx.

As culturas positivas para o gene *eae* foram utilizadas para se detectar os isolados de EPEC. Para esse isolamento, 100 µL da cultura positiva na triagem para o gene *eae* foram semeadas por esgotamento em uma placa de agar MC. Dez colônias de cada placa de MC foram repicadas em agar BHI e submetidas à nova extração de DNA e nova PCR para detectar o gene *eae,*

como mostra a Figura 1. Esta é uma metodologia do Laboratório de Referência para *E. coli* (ECL), da Universite de Montre' al '.

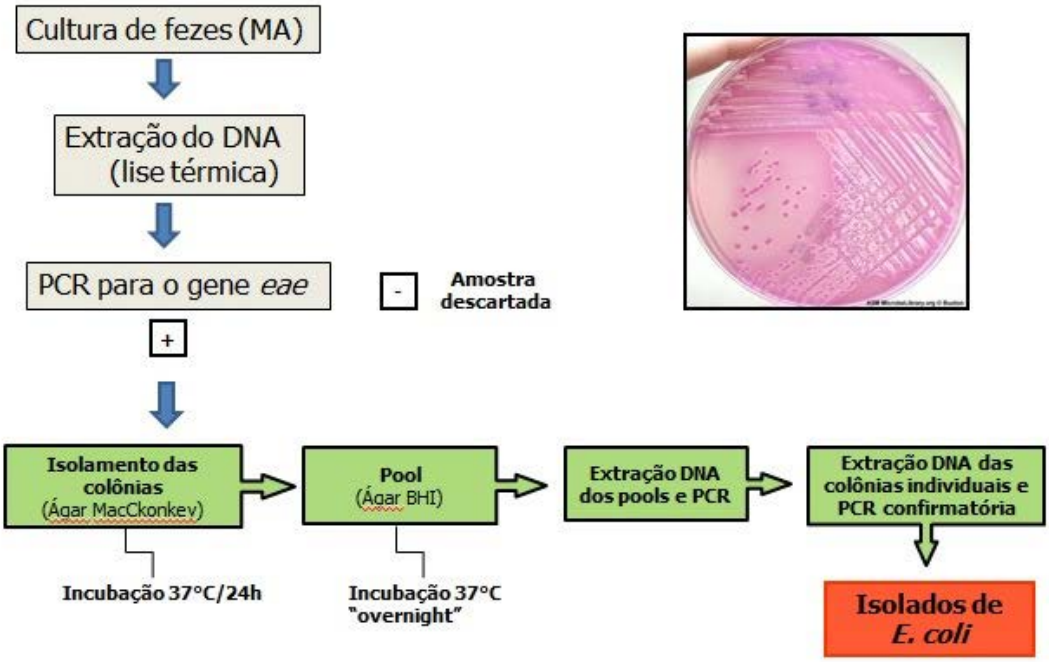

Figura 1: Fluxograma indicando os procedimentos adotados para se obter os isolados de EPEC.

4.3.Detecção dos fatores de virulência

Todos os isolados de EPEC (de búfalos, suínos e ovinos, e isolados de amostras humanas) foram testados para a presença de genes de virulência da região LEE e não LEE, tais como *esp*A, *esp*B (E2348/69), *esp*B (EO26), *esp*B (EDL933), *esp*D, *esp*D (EDL933), *esp*F, *tir*α, *tir*β, *tir*γ, *nle*A, *nle*B, *nle*E, *nle*F e *nle*H1-2. A Tabela 1 descreve com detalhes os genes que foram pesquisados e os respectivos iniciadores utilizados na amplificação e os iniciadores utilizados para a PCR dos genes *nle*A, *nle*B, *nle*E, *nle*F e *nle*H1-2, foram desenhados nesse projeto.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificar genes de virulência em isolados de EPEC.

Genes	Sequência de *primers* (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
eae	F - AGGCTTCGTCACAGTTG R - CCATCGTCACCAGAGGA	570	48°C	(China et al., 1996)
bfp	F- GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT R- GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	300	56°C	(Vidal et al., 2004)
espA	F- TTGTTATTCCCGGTTATTTACCAAGGGAT R - TAGTTATCTCCGGTTATTTACCAAGGGAT	570	50°C	(Mairena et al., 2004)
espB E2348/69	F - CGGGATCCCGTGAGATGGTCAC R - CGCTCGAGGGTTGGACTTGACA	600	55°C	(Mairena et al., 2004)
espB EDL933	F - GATAATACTCAAGTAACGATGGTT R - CCCAGCTAAGCGACCCGATT	920	59°C	(Mairena et al., 2004)
espB O26	F - AATCAAGTAATGACGGTTAAT R- AGCTAAGCGAACCGATTG	900	50°C	(Mairena et al., 2004)
espD	F - GTGACCATCTCACGCAAC R - CCTTGGTAAATAACCGGA	1,07	50°C	(Mairena et al., 2004)
espD EDL933	F - ATGCTTAACGTAAATAACGATACC R - AATTCGGCCACTAACAATACGACT	120	59°C	(Mairena et al., 2004)
espF	F - CCCCTCAGCCTGTTCGTCGTCTTACT R - TACCCTTTCTTCGTTGCTCATAG	520	54°C	(Mairena et al., 2004)
tirα	F - CRCCKCCAYTACCTTCACA R - CGCTAACCTCCAAACCATT	342	54°C	(China et al., 1999)
tirβ	F - CRCCKCCAYTACCTTCACA R - GATTTTTCCCTCGCCACTA	560	54°C	(China et al., 1999)
tirγ	F - CRCCKCCAYTACCTTCACA R - GTCGGCAGTTTCAGTTTCAC	781	54°C	(China et al., 1999)
chuA	F - GACGAACCAACGGTCAGGAT R - TGCCGCCAGTACCAAAGACA	270	55°C	(Clermont et al., 2000)
yjaA	F - TGAAGTGTCAGGAGACGCTG R - ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	55°C	(Clermont et al., 2000)

Genes	Sequência de *primers* (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
TspE4.C2	F - GAGTAATGTCGGGGCATTCA R - CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	55°C	(Clermont et al., 2000)
nleA	F - AACCGACCATACAATCTG R- AGTAGTGGCTGATGTTCC	548	42°C	Este trabalho[a]
nleB	F- CGTATAATCGGTGTGCTG R- ATATACATCCGCTACAGGG	400	44	Este trabalho[a]
nleE	F- AACGAGAAAGCCAGACGG R- CACGTGCGATAATCATTTCAG	400	50	Este trabalho[a]
nleF	F- CGGAATCAGTAAGTGAGC R- GCATTTCATTGCTCGTAG	401	42	Este trabalho[a]
nleH1-2	F- CTGACTTCGCCTGATAATC R- TACACGACAGCATTACCAC	416	44	Este trabalho[a]

4.4. PCR para determinar o perfil das estirpes de EPEC

As análises por PCR para os genes analisados (exceto para os genes da tipagem filogentética) foram realizadas da seguinte maneira: uma alíquota de 4 µL de DNA foi acrescentada à uma mistura de 16 µL, contendo 2,0 µL de uma solução tampão 100 mM Tris-HCl [pH 8.8] 15 mM MgCl2, 500 mM KCl, 1,6 µL de MgCl, 4µL de dNTP (2 mM), 0,8µL de cada primer (10 mM) e 1U de Taq DNA polimerase, e água MiliQ estéril até atingir o volume de 20 µL. Os ciclos de amplificação da PCR foram feitos nos seguintes tempos e temperaturas: t_1: 5 min a 94ºC; t_2: 30 segundos a 94ºC; t_3: 45 segundos a Tm[1] de cada primer (Tabela 1); t_4: 1 minuto a 72°C (t_2-t_4, 25 ciclos repetidos) e t_5: 7 minutos a 72°C. O produto da reação foi aplicado em um gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (1µg/mL) em tampão TEB (Tris-base 890mM, EDTA 25mM, ácido bórico 890mM, pH 8,2) e separados por eletroforese (70V/1h40). A

imagem do gel foi registrada em um fotodocumentador Fisher Scientific e observada em um computador.

4.5. Sorologia das estirpes de EPEC

As estirpes de APEC foram sorotipadas no "*E. coli* Reference Center" (ECRC) da Universidade Estadual da Pensilvânia (University Park, EUA), pelo método de sorotipagem padrão (ORSKOV et al., 1977) e por PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) do gene *fli*C responsável pelos flagelos, com base no procedimento descrito por Machado et al., (2000).

4.6. Subtipagem do gene *eae*

A subtipagem do gene eae foi realizada no "*E. coli* Reference Center" (ECRC) da Universidade Estadual da Pensilvânia (University Park, EUA). A sequência de nucleotídeos do produto da amplificação da PCR foi determinada pelo método de terminação da cadeia didesoxinucleotideos trifosfato pelo método de Sanger, com o kit de sequenciamento de ciclo v3.1 Big Dye Terminator com um analisador genético ABI 3100 (Applied Bio-Systems) descrito por Blanco et al. (2004).

4.7. Análise filogenética

A análise filogenética foi feita através da identificação dos genes *chu*A, *yja*A e TspE4C2 que foi realizada para os isolados de EPEC com os oligonucleotídeos iniciadores e seguindo a arvore dicotômica, segundo proposto por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). A classificação dos grupos

filogenéticos foi baseada na combinação de chuA, yjaA e TSPE4.C2: A ($chuA^-$, $TspE4.C2^-$, $yjaA^{-/+}$), B1 ($chuA2^-$, $TspE4.C2^+$, $yjaA2^-$), B2 ($chuA^+$, $TspE4.C2^{-/+}$, $yjaA^+$) and D ($chuA^+$, $TspE4.C2^{-/+}$, $yjaA^-$) como mostra a Figura 2.

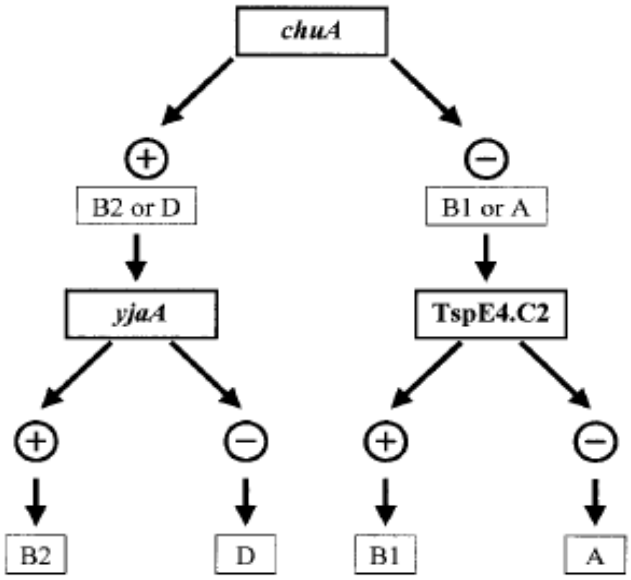

Figura 2. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de cepas de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR dos genes Chua, yjaA e TSPE4.

4.8. PFGE

A preparação dos plugues e a digestão do DNA cromossomal com *Xba* I foram realizadas como descrito anteriormente por Ribot et al. (2006). *Salmonella Enterica* sorotipo Braenderup H9812 (ATCC BAA-664) foi utilizada como referência de peso molecular. As condições de eletroforese foram: tempo inicial de 2,2 segundo, tempo final de 54,2 segundos em um gradiente de 6 V cm^{-1} e um ângulo de 120°. Os géis foram submetidos a eletroforese por 23h. A similaridade dos fragmentos foi comparada usando-se o coeficiente de Dice a 1% de tolerância e 0,5% de otimização e o dendrograma foi construído com o

método de agrupamento UPGMA, usando-se o programa BioNumerics versão 7.1 (Matemática Aplicada, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

4.9. Teste de resistência a antimicrobianos

O teste de resistência a antimicrobianos foi realizado utilizando-se discos impregnados com antimicrobianos (CEFAR). Após incubação por 16 horas em agar BHI os cultivos dos isolados foram adicionadas a tubos contendo 10 mL de água estéril até o padrão 0,5 de MacFarland ser atingido. O conteúdo dos tubos foi então colocado em placas contendo agar Muller-Hinton utilizando-se suabes estéreis e então os seguintes discos foram colocados usando-se precauções assépticas: ampicilina (10mg), cefalotina (30mg), estreptomicina (10mg), gentamicina, (10mg), ciprofloxacina (5mg), cloranfenicol (30mg), tetraciclina (30mg), nitrofurantoína (300mg), sulfametoxazol+trimetoprim (25mg), ceftiofur (30µg), amicacina (30µg), cefoxitina (30µg), kanamicina (30µg) e norfloxacina (10µg). As placas foram incubadas a 37℃ por 24h e os diâmetros dos halos de inibição completa foram medidos. Os halos foram comparados com os intervalos estabelecidos pelo CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE, 2007).

5. RESULTADOS

- Frequência de EPEC em amostras humanas

Das 396 culturas de fezes humanas analisadas foram obtidas 44 (11,1%) amostras positivas para o gene *eae* na PCR de triagem. A partir das 44 amostras positivas na PCR de triagem foram isoladas 26 estirpes de EPEC em amostras humanas. Dentre as 26 estirpes isoladas, aEPEC (eae+bfp-) foi encontrada em 20 (5,05%) dos isolados, enquanto tEPEC (eae+bfp+) foi encontrada em seis (1,5%) dos isolados.

- Genes de virulência das estirpes de EPEC

Nesse estudo 68 estirpes de EPEC foram analisadas, sendo 26 estirpes isoladas de humanos e 42 isoladas de animais. Seis estirpes foram caracterizadas como tEPEC e 62 como aEPEC. Genes contidos na região LEE foram encontrados com diferentes frequências. Após PCR para detecção dos genes de virulência, todos os isolados foram negativos para o gene *esp*D, enquanto os genes *esp*A, *nle*F, *nle*H1-2 e *esp*B E2348/69 foram os que apresentaram maior freqüência entre os isolados, como mostra a Tabela 2. O gene espB2348/69 apresentou uma maior frequência nos isolados de EPEC provenientes de humanos (73,0%) quando comparados aos isolados de animais (53,0%). Já os genes *esp*B EDL933 e *esp*D EDL933 apresentaram uma maior frequência nas estirpes isoladas de animais (38,0% e 12,0%, respectivamente).

A subtipagem do gene *eae* resultou em seis genótipos incluindo β1 (12 estirpes, 17,6%), β2 (quatro estirpes, 5,9%), γ1 (19 estirpes, 27,9%), ζ (cinco estirpes, 7,3%), κ (duas estirpes, 2,9%), o (uma estirpe, 1,5%). Vinte e cinco isolados não foram subtipados.

Quanto a subtipagem do tir observou-se que *tir*α foi o mais comum entre os isolados. Especificamente, *tir*α foi encontrado em 29 (42,6%) das estirpes, seguido por *tir*β com 16 (23,5%), e tirγ com cinco (7,3%) (Tabela 2). Dezoito

(26,5%) das estirpes foram negativas para todos os subtipos de *tir* estudados.

Tabela 2: Perfil dos genes de virulência das estirpes de EPEC isoladas de humanos e animais.

Hospedeiro	Frequência dos genes de virulência (%)														
	*esp*A	*bfp*	*esp*B E2348/69	*esp*B O26	*esp*B EDL933	*esp*F	*esp*D EDL933	*nle*F	*nle*B	*nle*A	*nle*E	*nle*H1-2	*tir*α	*tir*β	*tir*γ
Humanos	73%	23%	73%	23%	4%	27%	4%	69%	42%	11%	24%	69%	61,5%	23,1%	3,8%
Animais	78%	-	53%	11%	38%	19%	12%	78%	57%	36%	59%	78%	30,9%	23,8%	9,5%

- Sorotipagem e análise filogenética das estirpes de EPEC

As estirpes de aEPEC estudadas apresentaram uma grande diversidade de sorotipos, entretanto nas estirpes de EPEC isoladas de humanos o sorotipo mais frequente foi O8:H16 (duas estirpes). Já as aEPEC isoladas de búfalos apresentaram uma maior frequência do sorotipo O26:H11 (quatro estirpes). As aEPEC de suínos mostraram uma maior frequência do sorotipo O76:H7, como descrito na Tabela 3.

Os resultados da análise filogenética mostraram que 16 isolados de humanos e 23 isolados de animais pertencem ao grupo B1. Cinco isolados de humanos e 13 isolados de animais pertencem ao grupo A, composto por isolados comensais. Um isolado de humano e dois isolados de animais pertencem ao grupo B2, enquanto dois isolados de humanos e sete isolados de animais pertencem ao grupo D (Figura 3), constituídos pelas cepas de *E. Coli* que podem causar infecções extra-intestinais.

Tabela 3: Perfil dos genes de virulência, sorotipagem, e subtipagem do gene *eae* das estirpes de EPEC isoladas de humanos e animais.

	Sorologia	Subtipagem *eae*	*bfp*	*tir*	*esp*F	*esp*B O26	*esp*B E2348/69	*nle*F	*nle*B	*esp*B 933	*nle*A	*nle*E	*nle* H1-2	*esp*D 933	*espA*
24H	ONT:H6	β2	-	α	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25H	O115:H10	-	-	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
33H	O12:H19	-	-	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
39H	O51:H48	β1	-	β	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
41H	O88:HNT	-	+	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
53H	O181:H28	ζ	-	α	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
68H	O8:H16	ζ	-	α	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
77H	O109:H21	γ1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
150H	ONT:H7	γ1	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
164H	O111:H8	γ1	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
167H	O8:H19	-	-	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
169H	ONT:HNT	κ	+	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
175H	ONT:HNT	-	-	β	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
187H	ONT:HNT	γ1	-	γ	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
188H	O119:HNT	β1	+	β	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
193H	O70:HNT	-	-	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
204H	ONT:HNT	-	-	α	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
219H	O127:HNT	γ1	-	α	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
247H	O152:HNT	-	-	β	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
256H	ONT:HNT	-	-	α	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
258H	O160:H19	β1	-	α	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
266H	O8:H16	ζ	-	α	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
285H	O9:HNT	ζ	+	α	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
351H	O17:H18	-	-	β	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
364H	O161:HNT	γ1	-	α	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
378H	O69:HNT	β1	-	β	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
1	ONT:H8	-	-	α	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
2	O12:H19	γ1	-	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
3	O68:H8	-	-	α	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
4	0146:H21	-	-	α	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
5	0128:H2	β1	-	β	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
6	ONT:HNT	γ1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
7	ONT:H11	β1	-	β	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
8	O179:H31	ζ3	-	α	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	O108:H21	γ1	-	α	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
10	ONT:H6	β2	-	α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	ONT:HNT	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
12	O13:HNT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
13	ONT:HNT	-	-	β	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+

	Sorologia	Subtipagem *eae*	*bfp*	*tir*	*esp*F	*esp*B O26	*esp*B E2348/69	*nle*F	*nle*B	*esp*B 933	*nle*A	*nle*E	*nle* H1-2	*esp*D 933	*espA*
14	O160:H19	-	-	α	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
15	O152:HNT	-	-	β	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
16	ONT:HNT	γ1	-	γ	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
17	O26:H11	β1	-	β	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
18	O26:H11	β1	-	β	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
19	0176:H11	β1	-	β	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
20	O145:HNT	γ1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
21	O87:H16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	ONT:H11	β1	-	β	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
23	O179:HNT	γ1	-	γ	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
24	O26:H11	-	-	β	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
25	O26:H11	β1	-	β	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
26	ONT:H6	β2	-	α	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
27	ONT:H19	β2	-	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
28	ONT:HNT	γ1	-	γ	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
29	ONT:H10	κ	-	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
30	ONT:H19	β2	-	α	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
31	O76:H7	γ1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
32	O76:H7	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
33	O76:H7	γ1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
34	O51:H53	γ1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
35	ONT:HNT	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
36	O69:HNT	γ1	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
37	O76:H7	γ1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
38	O76:H7	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
39	O49:H10	-	-	α	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
40	O103:H40	o	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
41	ONT:H40	γ1	-	γ	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
42	O76:H7	β1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+

H- isolados humanos; 1-16: estirpes de EPEC isoladas de ovinos; 17-27: estirpes de EPEC isoladas de búfalos; 28-42: estirpes de EPEC isoladas de suínos

NT-não tipável

Todos os isolados foram negativos para o gene *esp*D.

- Análise dos isolados de EPEC por PFGE

Dentre as 68 estirpes isoladas, oito não foram tipáveis utilizando-se a enzima *Xba*I. As 60 cepas geraram 55 perfis diferentes de PFGE, também chamados de pulsotipos. Apenas cinco pulsotipos foram compartilhados por mais de um isolado, sendo eles 22, 25, 17, 18, 285H, 364H, 33, 38, 20 e 23. Todos os outros isolados foram agrupados em pulsotipos únicos, demonstrando um grau elevado de heterogeneidade entre as *E. coli* das fontes examinadas. Cada cluster foi composto por estirpes pertencentes a diferentes sorotipos isolado a partir de animais e seres humanos. O dendrograma gerado por PFGE apresentou seis “clusters” e é mostrado na Figura 3.

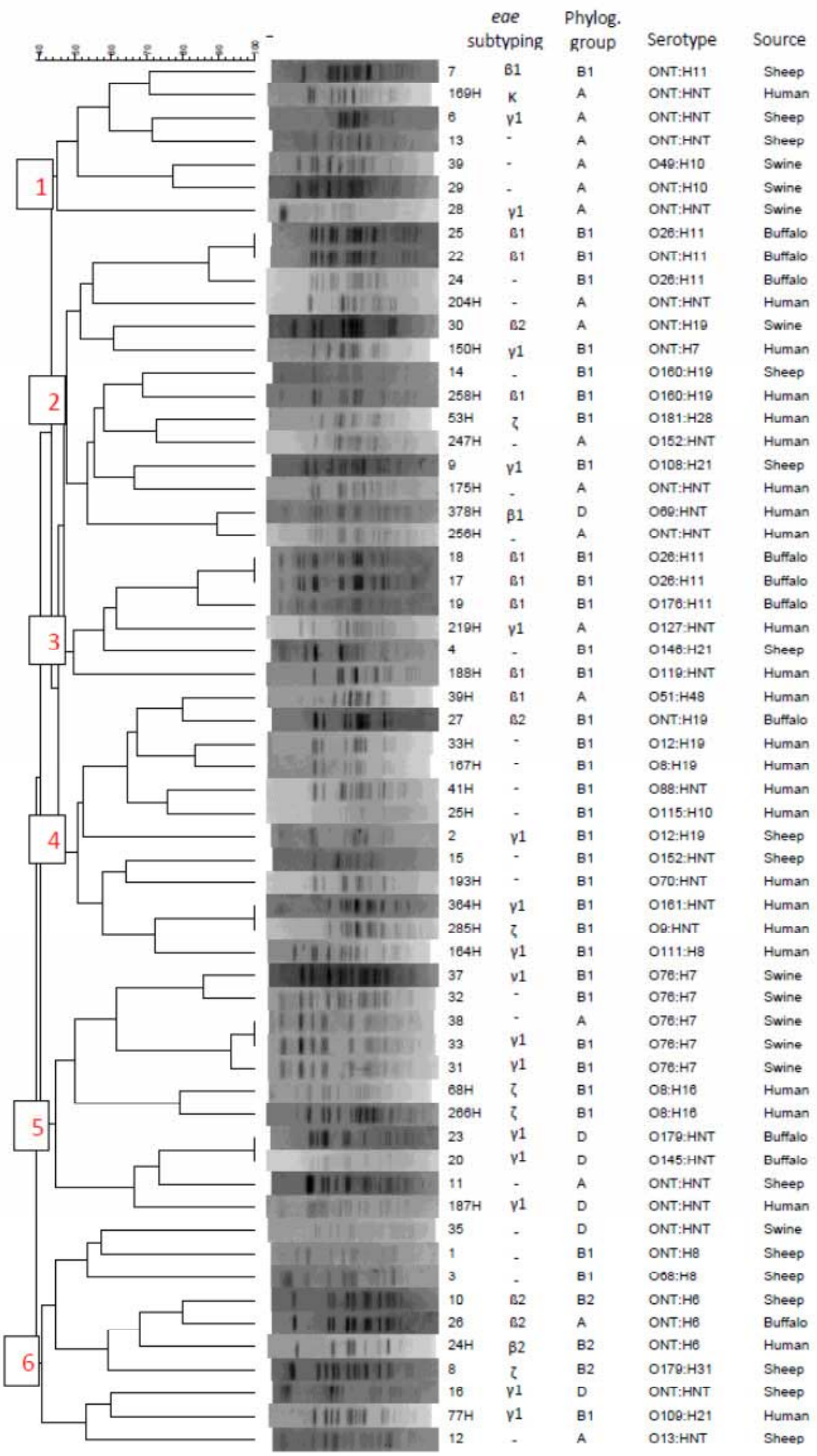
eae subtyping
Phylog. group
Serotype
Source
1
2
3
4
5
6
7 ß1 B1 ONT:H11 Sheep
169H κ A ONT:HNT Human
6 γ1 A ONT:HNT Sheep
13 - A ONT:HNT Sheep
39 - A O49:H10 Swine
29 - A ONT:H10 Swine
28 γ1 A ONT:HNT Swine
25 ß1 B1 O26:H11 Buffalo
22 ß1 B1 ONT:H11 Buffalo
24 - B1 O26:H11 Buffalo
204H - A ONT:HNT Human
30 ß2 A ONT:H19 Swine
150H γ1 B1 ONT:H7 Human
14 - B1 O160:H19 Sheep
258H ß1 B1 O160:H19 Human
53H ζ B1 O181:H28 Human
247H - A O152:HNT Human
9 γ1 B1 O108:H21 Sheep
175H - A ONT:HNT Human
378H β1 D O69:HNT Human
256H - A ONT:HNT Human
18 ß1 B1 O26:H11 Buffalo
17 ß1 B1 O26:H11 Buffalo
19 ß1 B1 O176:H11 Buffalo
219H γ1 A O127:HNT Human
4 - B1 O146:H21 Sheep
188H ß1 B1 O119:HNT Human
39H ß1 A O51:H48 Human
27 ß2 B1 ONT:H19 Buffalo
33H - B1 O12:H19 Human
167H - B1 O8:H19 Human
41H - B1 O88:HNT Human
25H - B1 O115:H10 Human
2 γ1 B1 O12:H19 Sheep
15 - B1 O152:HNT Sheep
193H - B1 O70:HNT Human
364H γ1 B1 O161:HNT Human
285H ζ B1 O9:HNT Human
164H γ1 B1 O111:H8 Human
37 γ1 B1 O76:H7 Swine
32 - B1 O76:H7 Swine
38 - A O76:H7 Swine
33 γ1 B1 O76:H7 Swine
31 γ1 B1 O76:H7 Swine
68H ζ B1 O8:H16 Human
266H ζ B1 O8:H16 Human
23 γ1 D O179:HNT Buffalo
20 γ1 D O145:HNT Buffalo
11 - A ONT:HNT Sheep
187H γ1 D ONT:HNT Human
35 - D ONT:HNT Swine
1 - B1 ONT:H8 Sheep
3 - B1 O68:H8 Sheep
10 ß2 B2 ONT:H6 Sheep
26 ß2 A ONT:H6 Buffalo
24H β2 B2 ONT:H6 Human
8 ζ B2 O179:H31 Sheep
16 γ1 D ONT:HNT Sheep
77H γ1 B1 O109:H21 Human
12 - A O13:HNT Sheep

Figura 3: Dendrograma mostrando relação de similaridade estabelecida por PFGE utilizando-se o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA.

-Teste de sensibilidade a antimicrobianos

As estirpes de EPEC provenientes de humanos apresentaram uma maior taxa de resistência a canamicina, cefalotina, nitrofurantoina e estreptomicina. Já as amostras de búfalos e ovinos foram mais resistentes a ciprofloxacina e nitrofurantoina, enquanto os suínos mostraram uma multirresistência para tetraciclina, kanamicina, amicacina e ampicilina, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Teste de sensibilidade aos antimicrobianos das estirpes de EPEC isoladas de animais e humanos.

Isolados	NOR	KAN	GEN	CIP	CFL	CLO	SUT	CRO	TET	NIT	AMP	AMI	CFO	EST
24H	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R
25H	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R
33H	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R
39H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
41H	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
53H	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R
68H	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R
77H	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R
150H	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R
164H	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R
167H	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
169H	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
175H	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
187H	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R
188H	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
193H	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R
204H	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R

219H	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R
247H	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R
256H	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R
258H	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S
266H	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R
285H	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
351H	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
364H	S	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R
378H	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
1	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
2	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S
3	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
5	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
6	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
7	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
8	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S
10	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
12	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
16	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
19	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R
20	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
23	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
24	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
25	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
26	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
27	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R

28	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
29	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
30	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	R
31	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S
32	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	R
33	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
34	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
35	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
36	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
37	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R
38	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
39	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
40	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
41	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
42	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S

6. DISCUSSÃO

Este trabalho descreveu o papel de alguns animais que podem atuar como reservatórios e possíveis fontes de infecção de aEPEC em humanos. Em vários países, a frequência de aEPEC está aumentando em relação a tEPEC, e é atualmente considerado um importante patógeno diarreiogênico para crianças (AFSET et al., 2004; BUERIS et al., 2007). Além disso, Trabulsi, Keller e Gomes (2002) observaram que aEPEC pode ser menos virulenta do que tEPEC, possivelmente por causa da ausência do plasmídeo EAF. No entanto, é sugerido que cepas atípicas podem possuir outros fatores de virulência que podem compensar a ausência deste plasmídio.

Os presentes dados sugerem que aEPEC (5,05%) são mais frequentemente encontradas em humanos do que tEPEC (1,5%). Atualmente, aEPEC têm sido isoladas de crianças saudáveis (BEUTIN et al., 2003; PABST et al., 2003; JENKINS et al., 2006), sendo que mais estudos são necessários para estabelecer o significado clínico deste achado. Na Suíça, Pabst et al. (2003) detectaram aEPEC nas amostras de 30 (16,0%) de 187 crianças com diarreia, e em 15 (11,0%) de 137 crianças sem diarreia. Vieira et al. (2001) verificaram que no Brasil 32 (6,3%) de 505 pacientes com diarreia e 27 (5,3%) dos 505 pacientes do grupo controle (sem diarreia) carregavam estirpes de aEPEC, demonstrando que esse patótipo aparece em prevalência semelhante em pacientes com e sem diarreia, indicando que humanos podem ser considerados como fonte de infecção de aEPEC.

Bolton, Ennis e McDowell (2014) encontraram uma prevalência de 5,8% de aEPEC em amostras de fezes bovinas. Resultado semelhante foi observado por Cortes et al. (2005), que obtiveram uma frequência de 7,7% de aEPEC em amostras fecais de ovinos na Espanha. Krause, Zimmermann e Beutin (2005) detectaram que 17,6% das amostras de fezes de suínos e 19,2% das amostras fecais de ovinos foram positivas para aEPEC na Alemanha, demonstrando uma possível diversidade nas populações estudadas, e que esses animais podem ser considerados reservatórios de aEPEC.

As estirpes de EPEC mais estudadas pertencem a sorogrupos que foram reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde como clássicos de EPEC, que são o O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158. Estes incluem tanto os sorogrupos de estirpes de EPEC típicas como atípicas, assim como outras categorias de *E. coli* diarreogênicas (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Além disso, de acordo com estudos anteriores (ZANG et al., 2002; BEUTIN et al., 2003), pode-se observar que humanos podem ser infectados por uma grande variedade sorológica de EPEC. No presente estudo, as estirpes de EPEC pertenciam a 39 sorotipos O:H. Moura et al. (2009) observaram que estirpes de EPEC isoladas de animais e humanos pertenciam a 11 sorotipos O:H. Blanco et al. (2006a) encontraram 69 sorotipos O:H em amostras de EPEC isoladas de pacientes com diarreia na Espanha.

Dentre os 39 sorotipos O:H encontrados no presente estudo, quatro estirpes de aEPEC isoladas de búfalos e uma de ovinos pertenciam a sorogrupos clássicos de EPEC (O26:H11 e O128:H2, respectivamente). Blanco et al. (2004) encontraram cepas de STEC (stx1+, eae+) pertencentes ao sorotipo O26:H11 e O111 em pacientes com diarreia na Espanha. Krause, Zimmermann e Beutin (2005) identificaram o sorotipo O26:H11 como o mais frequente em EPEC isoladas de suínos.

Dentre as aEPEC isoladas de humanos no presente estudo o sorotipo mais frequente foi o O8:H16. Galli et al. (2010) encontraram esse mesmo sorotipo em STEC isoladas de bovinos e um paciente humano com SHU na Argentina. Moura et al. (2009) detectaram estirpes de aEPEC pertencentes ao sorogrupo O125 isolados de humanos e gatos no Brasil, sendo que no presente estudo foi encontrado esse sorogrupo isolado de aEPEC de amostras fecais de ovinos, mostrando que humanos e animais podem compartilhar de patótipos com o mesmo sorogrupo. Kozub-Witkowski et al. (2007) encontraram o sorotipo O76:H7 em aEPEC isoladas de crianças com diarreia na Alemanha. Esse mesmo sorotipo foi o mais frequente nos isolados de suínos no presente estudo (seis estirpes), sendo também detectado por Ramachandram et al. (2003) em isolados de EPEC provenientes de bovinos.

Cortés et al. (2005) encontraram os sorotipos O156:H25 e O177:H11 como os mais frequentes em amostras de EPEC isoladas de ovinos na Espanha. Enquanto que Fröhlicher et al. (2008) encontraram os sorotipos O146:H21, O2:H40 e O26:H11 como os mais frequentes em EPEC isoladas de ovinos na Suiça, demonstrando diversidade sorológica entre as estirpes de diferentes países.

Segundo Trabulsi, Keller e Gomes (2002) alguns sorotipos são heterogêneos e incluem diferentes clones ou linhagens genéticas, e mostraram, por exemplo, que algumas estirpes O26: H11 produtoras da toxina Stx isolados na Europa e América são geneticamente diferentes das cepas Stx-negativos pertencentes ao mesmo sorotipo isolado no Brasil.

Existem poucas informações a respeito da frequência de isolados de EPEC no Brasil, Uruguai e Bangladesh (GOMES et al., 1991; NUNES et al., 2003; VIDAL et al., 2004) mas alguns estudos mostraram alta frequência de sorotipos de tEPEC nas fezes de pessoas com diarreia. No entanto, alguns estudos têm demonstrado uma menor frequência de tEPEC e uma frequência relativamente alta de aEPEC (VIEIRA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2004). Blanco et al. (2006a) encontraram uma prevalência de 5,2% de aEPEC em pacientes com diarreia e uma frequência de apenas 0,2% de tEPEC nessas amostras. Resultado semelhante foi observado por Araujo et al. (2007), que observaram a prevalência de aEPEC (5,1%) em crianças com diarreia no Brasil em ralação a tEPEC (0,2%).

A subtipagem do gene *eae* nas 68 estirpes de EPEC desse estudo revelou seis subtipos encontrados, sendo β1, β2, γ1, ζ, κ e o. Os subtipos α, β e γ são os mais frequentes em estirpes de EPEC que foram isoladas a partir de humanos (OSWALD et al., 2000; ZHANG et al., 2002). Resultado semelhante foi observado por Beutin, et al. (2003) que encontraram esses mesmos subtipos do gene *eae* em crianças saudáveis na Alemanha e Australia. Blanco et al. (2006b) encontraram os subtipos β1 e β2 como os mais frequentes em estirpes de EPEC isoladas de crianças com diarreia em Montevideo. Jenkins et al. (2006) detectaram os subtipos γ1 e γ2 como os mais frequentes em pacientes saudáveis e com diarreia na Inglaterra.

Aidar-Ugrinovich et al. (2007) encontraram o subtipo β1 como mais frequente em EPEC isoladas de bovinos no Brasil. Cortés et al. (2005) também observaram que o subtipo β1 foi o mais prevalente nas estirpes de EPEC isoladas de ovinos, seguido dos subtipo γ2. Fröhlicher et al. (2008) detectaram o subtipo γ2, seguido de β1 em estirpes de EPEC isoladas de ovinos e suínos na Suíça. Moura et al. (2009) detectaram o subtipo β1 como o mais frequente em estirpes de EPEC isoladas de animais e humanos. No presente estudo os sorogrupos γ1 e β1 foram os mais frequentes nas estirpes de aEPEC de humanos e animais, estando de acordo com os estudos anteriores. A diferenciação dos subtipos de Intimina representa uma importante ferramenta para estudos epidemiológico e clonais, já que a extremidade C-terminal da intimina é responsável pela ligação ao receptor celular, e tem sido sugerido que diferentes subtipos de intimina podem ser responsáveis pelos diferentes tropismos celulares nos tecidos do hospedeiro (BLANCO et al., 2003).

Moura et al. (2009) encontraram os genes *esp*B e *esp*D em 100% das estirpes de EPEC isoladas de várias fontes, incluindo humanos. Enquanto o gene *esp*A foi encontrado em 81,6% das amostras. Mairena et al. (2004) encontraram o gene *esp*A em 94% das estirpes de EPEC isoladas de pacientes com diarreia no Brasil, seguido dos genes *esp*B (90%) e *esp*D (78%). No presente estudo, o gene espB E2348/69 apresentou uma frequência de 73,1% nas estirpes de EPEC isoladas de humanos e 53,0% nas estirpes isoladas de animais. Quanto ao gene *esp*D os resultados do presente estudo divergem de trabalhos anteriores, pois todas as estirpes de EPEC examinadas foram negativas para este gene. A diferença entre estes resultados e os do presente estudo pode ser explicada por diferenças nas populações de aEPEC, e uma possível variabilidade no gene *esp*D, indicando que podem ser um grupo altamente heterogêneo.

No presente estudo o gene *esp*A foi encontrado em 73,0% das estirpes de EPEC isoladas de humanos e 78,0% das estirpes isoladas de animais, estando de acordo com estudos anteriores. Esse gene é importante por ser um dos responsáveis pela adesão inicial da EPEC na célula hospedeira, além da translocação de proteínas efetoras do citoplasma bacteriano para o citoplasma da célula hospedeira (CLEARY et al., 2004; HERNANDES et al., 2009).

O gene *esp*F foi encontrado em 26,9% das estirpes de EPEC isoladas de humanos e em 19,0% das estirpes provenientes de animais. Moura et al. (2009) detectaram esse mesmo gene em 42,8% das estirpes de EPEC isoladas de varias fontes. Alguns autores relacionam o gene *esp*F com varias funções que auxiliam no processo da patogênese de EPEC, dentre elas estão disfunção mitocondrial, inibição da apoptose, antifagocitose e maturação do pedestal de actina (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004; DEAN; KENNY, 2009).

A função exata de alguns efetores *nle* ainda permanecem desconhecidas, mas um estudo de isolados clínicos de pacientes com SHU, diarreia, e grupo controle mostraram que *nle*A estava presente em 53,0% de todas as estirpes de EPEC testadas. Em contraste, esse gene foi detectado em 86,0% da estirpes de EHEC. Curiosamente, há uma associação estatisticamente significativa entre a presença de *nle*A e o isolamento de estirpes de EHEC em pacientes que sofrem de infecções mais graves (MUNDY et al., 2004). Gruenheid et al. (2004) relataram que esse gene pode ser um fator-chave de virulência de EPEC. Bugarel et al. (2011) encontraram estirpes de EPEC isoladas de humanos contendo os genes *nle*A, *nle*B, *nle*E e *nle*H1-2. No presente trabalho o gene *nle*A apresentou frequência de 11,3% entre estirpes de EPEC isolados de humanos e 36,0% das estirpes isoladas de animais, enquanto os genes *nle*F e *nle*H1-2 foram os mais frequentes nas estirpes de EPEC estudadas. Estudos recentes tem demonstrado que o gene *nle*H e *nle*E desempenham papel na colonização e na virulência de EPEC (HEMRAJANI et al., 2008; ZURAWSKI et al., 2008), enquanto *nle*H ainda estaria envolvido na inibição da apoptose (HEMRAJANI et al., 2010).

Aliado a isso, outros efetores nle foram associados a diarreia em humanos, como o *nle*B e *nle*E (AFSET et al., 2006). No presente trabalho o gene *nle*B foi encontrado em 42,0% das EPEC isoladas de humanos e 57,0% das estirpes isoladas de animais, enquanto o gene *nle*E obteve uma prevalência de 23,1% em estirpes de EPEC isoladas de humanos e 59,0% nas estirpes provenientes de animais, mostrando que uma alta porcentagem dos isolados podem ser potencial patógenos para humanos.

Moura et al. (2009) detectaram o gene *tir*β como o mais prevalente em estirpes de EPEC isoladas de vários animais e humanos. CHINA et al. (1999)

encontraram o gene *tir*γ como o mais prevalente em estirpes de EPEC isoladas de humanos com diarreia, enquanto o gene *tir*β foi o mais prevalente em bovinos. Os resultados do presente trabalho divergem dos estudos anteriores, pois o gene *tir*α foi o mais prevalente nas estirpes de EPEC isoladas de humanos (61,5%) e animais (30,9%). A prevalência dos subtipos desse gene é pouco estudada, e Tir é conhecido por ser uma das proteínas de EPEC que é inserida na membrana da célula hospedeira, onde atua como receptor para a Intimina (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Em relação ao PFGE, os resultados são bastante semelhantes aos relatados em outros estudos que demonstram alta variabilidade epidemiológica entre as estirpes de EPEC. Nakhjavani et al. (2013) e Afset et al. (2003) também observaram que estirpes de EPEC isoladas de crianças com diarreia no Iran e Noruega apresentaram uma alta heterogenicidade quando comparadas pelo PFGE. Blanco et al. (2006b) também detectaram uma alta diversidade clonal entre EPEC isoladas de crianças com diarreia em Montevideu. Além disso, Moura et al. (2009) detectaram que estirpes de EPEC isoladas de humanos e animais mostraram uma alta variabilidade epidemiológica, assim como neste trabalho.

De acordo em Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) *E. coli* é composto por quatro grupos principais filogenéticos (A, B1, B2 e D). No presente estudo a maioria dos isolados pertenceram ao grupo B1 (61,5% das estirpes isoladas de humanos e 54,7% das estirpes isoladas de animais), que tem como característica serem bactérias provenientes de animais, enquanto alguns isolados pertenciam aos grupos B2 (3,8% das EPEC isoladas de humanos e 4,7% das estirpes provenientes de animais) e D (7,7% das estirpes isoladas de humanos e 16,7% das estirpes provenientes de animais), que tem como característica serem estirpes virulentas extra-intestinais. Kotlowski et al. (2007) detectaram que estirpes de *E. coli* pertencentes aos grupos B2 e D são mais prevalentes em pacientes com doenças inflamatórias intestinais.

Jenkins et al. (2006) detectaram que 11,0% de estirpes de EPEC isoladas de humanos na Inglaterra apresentaram multirresistência aos antimicrobianos testados, sendo a maior taxa de resistência encontrada para a ampicilina. Resultado semelhante foi encontrado por Nakhjavani et al. (2013),

que detectaram 39,0% de multirresistência nas estirpes de aEPEC isoladas de crianças com diarreia no Iran. Esses resultados divergem dos encontrados no presente trabalho, pois foi detectado 76,9% de multirresistência aos antimicrobianos testados nas amostras de humanos, sendo a maior resistência observada para a estreptomicina (84,0%), seguido da kanamicina (76,0%), e todos os isolados de humanos foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Essa diferença pode mostrar que as taxas de resistência de EPEC a diferentes antimicrobianos podem diferir entre os países ou locais estudados. Entre as estirpes de EPEC isoladas de animais as amostras de búfalos e ovinos apresentaram sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados, enquanto as amostras isoladas de suínos apresentaram uma alta taxa de multirresistência, e esses resultados estão de acordo com outros trabalhos (STEPHAN; SCHUMACHER, 2001; OLIVEIRA et al., 2007; ENNE et al., 2008).

De um modo geral, os perfis dos fatores de virulência das estirpes isoladas de seres humanos e animais foram semelhantes e mostraram proximidade. Por conseguinte, os animais podem desempenhar um papel como reservatórios e fonte de infecção de EPEC para os seres humanos, como sugerido anteriormente por outros autores (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; CARVALHO et al., 2007).

Estirpes de *E. coli* consideradas como potencial agentes de doença podem ser transmitidas direta ou indiretamente entre seres humanos e animais (RODRIGUES et al., 2004). Alguns desses animais sendo fonte de infecção de aEPEC podem representar risco indireto para veiculação de patótipos de *E. coli* que foram encontrados em alimentos de origem animal (HUSSEIN; BOLLINGER, 2005).

A presença de tipos de EPEC potencialmente patogênicas para humanos e EPEC isoladas de animais podem indicar que a transmissão desses microrganismos entre animais e seres humanos pode ocorrer e ter um impacto sobre a saúde pública. Além disso, o papel destes animais como reservatórios de aEPEC deve ser considerado nas investigações de surtos de diarreia por *E. coli*.

7. CONCLUSÕES

7.1.aEPEC neste trabalho foram mais comumente encontradas em amostras isoladas de humanos do que tEPEC.

7.2.As estirpes de EPEC isoladas apresentaram vários genes de virulência, sendo que os genes *esp*A, *nle*F, *nle*H1-2 e *esp*B E2348/69 foram os que apresentaram maior frequência entre os isolados de EPEC de animais e humanos. As EPEC de humanos e animais compartilharam de perfis de virulência semelhantes, mostrando que esses animais podem ser reservatórios de *E. coli* potencialmente patogênicas para os seres humanos.

7.3.A subtipagem do gene *eae* resultou em seis genótipos incluindo β1, β2, γ1, ζ, κ e o, sendo os subtipos γ1 e β1 os mais frequentes entre as estirpes de EPEC estudadas.

7.4.A maioria dos isolados de EPEC pertenciam ao grupo filogenético B1, porem algumas estirpes pertenciam aos grupos B2 e D, constituídos por estirpes de *E. Coli* que podem causar infecções extraintestinais.

7.5.As estirpes de EPEC estudadas apresentaram uma grande diversidade de sorotipos, entretanto algumas estirpes pertenciam a sorotipos clássicos de EPEC que são associados a diarreia em humanos, como O26:H11.

7.6.Estirpes de EPEC provenientes de humanos e suínos mostraram uma alta taxa de multirresistência frente os antimicrobianos testados, enquanto estirpes isoladas de ovinos e búfalos apresentaram uma alta taxa de sensibilidade;

7.7.Os isolados de EPEC demonstraram um grau elevado de heterogeneidade entre as *E. coli* das fontes examinadas. Cada cluster foi composto por estirpes pertencentes a diferentes sorotipos isolados a partir de animais e seres humanos.

8. REFERÊNCIAS

ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONCALVES, A. G.; TRABULSI, L. R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 662–668, 1998.

AFSET, J. E.; ANDERSSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2280-2290, 2008.

AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with Diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p.1015–1019, 2003.

AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1137–1144, 2004.

AFSET, J. E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.3703-3711, 2006.

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D. L.; SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic E. coli (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.297–306, 2007.

ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R. S.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M. F.; SCALETSKY, I. C. A. Typical Enteroaggregative and Atypical Enteropathogenic Types of *Escherichia coli* Are the Most Prevalent Diarrhea-Associated Pathotypes among Brazilian Children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3396–3399, 2007.

BEUTIN, L.; MARCHE´ S, O.; BETTELHEIM, K. A.; GLEIER, K.; ZIMMERMANN, S.; SCHMIDT, H.; OSWALD, E. Hep-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. **Infection and Immunity**, v.71, p.3995–4002, 2003.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P.; DAHBI, G.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Sheep in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1351–1356, 2003.

BLANCO,J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; DAHBI, G.; COIRA, M.A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology,** v.42, p.311-319, 2004.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; ALONSO, M. P.; MORA, A.; COIRA, M. A.; MADRID, C.; JUÁREZ, A.; BERNÁRDEZ, M. I.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **International Microbiology**, v.9, p.103-110, 2006a.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M. P.; VARELA, G.; GADEA, M. P.; SCHELOTTO, F.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (mB and jR/b2B). **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1165–1174, 2006b.

BIELASZEWSKA, M.; SONNTAG, A. K.; SCHMIDT, M. A.; KARCH, H. Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. **Microbes and Infection**, v.9, p.891-897, 2007.

BOLTON, D. J.; ENNIS, C.; McDOWELL, D. Occurrence, Virulence Genes and Antibiotic Resistance of Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) from Twelve Bovine Farms in the North-East of Ireland**. Zoonoses and Public Health,** v.61, p. 149-156, 2014.

BUGAREL, M.; BEUTIN, L.; SCHEUTZ, F.; LOUKIADIS, E.; FACH, P. Identification of Genetic Markers for Differentiation of Shiga Toxin-Producing, Enteropathogenic, and Avirulent Strains of *Escherichia coli* O26. **Applied Environmental Microbiology**, v.77, p.2275–2281, 2011.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; DOS SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.839–844, 2007.

CAMPELLONE, K. G.; ROBBINS, D.; LEONG, J. M. EspFU Is a Translocated EHEC Effector that Interacts with Tir and N-WASP and Promotes Nck-Independent Actin Assembly. **Developmental Cell**, v. 7, p.217–228, 2004.

CARVALHO, V. M.; GYLES, C. L.; ZIEBELL, K.; RIBEIRO, M. A.; CATA˜O-DIAS, J. L.; SINHORINI, I. L.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology,** v.41, p.1225–1234, 2003.

CARVALHO, V. M.; IRINO, K.; ONUMA, D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. 2007. Random amplification of polymorphic DNA reveals clonal relationships among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from non-human primates and humans. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v.40, p.237–241, 2007.

CHINA, B.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letteres**, v.178, p.177-182, 1999.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.3462–3465, 1996.

CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.41, p.93-98, 2001.

CLEARY, J.; LAI, L.; SHAW, R. K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M. S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v.150, p.527–538, 2004.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.4555–4558, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement, CLSI document M100-S17**. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2007.

CORTÉS, C.; DE LA FUENTE, R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DHABI, G.; MORA, A.; JUSTEL, P.; CONTRERAS, A.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; ORDEN, J. A. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. **Veterinary Microbiology** v.110, p. 67–76, 2005.

CREASEY, E. A.; FRIEDBERG, D.; SHAW, R. K.; UMANSKI, T.; KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; FRANKEL, G. CesAB is an enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB. **Microbiology**, v.149, p.3639-3647, 2003.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p.26-38, 2010.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.28-34, 2005.

DEAN, P.; KENNY, B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. **Current Opinion in Microbiology**, v.12, p.101–109, 2009.

ENNE, V. I.; CASSAR, C.; SPRIGINGS, K.; WOODWARD, M. J.; BENNETT, P. M. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant E. coli from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. **FEMS Microbiology Letters,** v. 278, p. 193-199, 2008.

ESTRADA-GARCIA, T.; LOPEZ-SAUCEDO, C.; THOMPSON-BONILLA, R.; ABONCE, M.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; SANTOS, J. I.; ROSADO, J. L.; DUPONT, H. L.; LONG, K. Z. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.93-98, 2009.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v.30, p.911-921, 1998.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C.; KELLER, R.; GOMES, T. A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.359-363, 2005.

FRÖHLICHER, E.; KRAUSE, G.; ZWEIFEL, C.; BEUTIN, L.; STEPHAN, R. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. **BMC Microbiology**, v.8, p.1-6, 2008.

GALLI, L.; MILIWEBSKY, E.; IRINO, K.; LEOTTA, G.; RIVAS, M. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans. **Veterinary Microbiology,** v.143, p.307-313, 2010.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 2573–2585, 2005.

GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; WACHSMUTH, I. K.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Enteropathogens associated with acute diarrheal, diseases in urban infants in São Paulo, Brazil. **Journal Infection Disease***,* v.164, p.331-337, 1991.

GRUENHEID, S.; SEKIROV, I.; THOMAS, N. A.; DENG, W.; O'DONNELL, P.; GOODE, D.; LI, Y.; FREY, E. A.; BROWN, N. F.; METALNIKOV, P.; PAWSON, T.; ASHMAN, K.; FINLAY, B. B. Identification and characterization of NleA, a non-LEE encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v. 51, p.1233–1249, 2004.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal of Animal Science,** v. 85, p. E45-E62, 2007.

HEMRAJANI, C.; MARCHES, O.; WILES, S.; GIRARD, F.; DENNIS, A.; DZIVA, F.; BEST, A.; PHILLIPS, A. D.; BERGER, C. N.; MOUSNIER, A.; CREPIN, V. F.; KRUIDENIER, L.; WOODWARD, M. J.; STEVENS, M. P.; LA RAGIONE, L. M.; MACDONALD, T. T.; FRANKEL, G. Role of NleH, a Type III Secreted Effector from Attaching and Effacing Pathogens, in Colonization of the Bovine, Ovine, and Murine Gut. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 4804–4813, 2008.

HEMRAJANI, C.; BERGER, C. N.; ROBINSON, K. S.; MARCHÈS, O.; MOUSNIER, A.; FRANKEL, G. NleH effectors interact with Bax inhibitor-1 to block apoptosis during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p. 3129–3134, 2010.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli.* **FEMS Microbiology Letters**, v.297, p.137–149, 2009.

HUSSEIN, H. S.; BOLLINGER, L. M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. **Meat Science**, v.71, p.676–689, 2005.

IGUCHI, A.; THOMSON, N. R.; OGURA, Y. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. **Journal of Bacteriology,** v.191, p.347–354, 2009.

ISHII, S.; MEYER, K. P.; SADOWSKY, M. J. Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains from Diverse Human and Animal Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 5703–5710, 2007.

JARVIS, K. G.; GIRON, J. A.; JERSE, A. E.; MCDANIEL, T. K.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.7996-8000, 1995.

JENKINS, C.; LAWSON, A. J.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G. A.; WRIGHT, P.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G.; SMITH, H. R. Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. **Molecular Cell Probes**, v.17, p.149-156, 2003.

JENKINS, C.; SMITH, H.R.; LAWSON, A.J.; WILLSHAW, G.A.; CHEASTY, T.; WHEELER, J.G.; TOMPKINS, D.S. Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in England from 1993 to 1996. **European Journal of Clinical Microbiology,** v.25, p.19–24, 2006.

JORES, J., K. ZEHMKE, J. EICHBERG, L. RUMER, AND L. H. WIELER. Description of a novel intimin variant (type) in the bovine O84:NM verotoxinproducing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. **Experimental Biology and Medicine**, v.228, p.370–376. 2003.

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

KALMAN, D.; WEINER, O. D.; GOOSNEY, D. L.; SEDAT, J. W.; FINLAY, B. B.; ABO, A.; BISHOP, J. M. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals**. Nature Cell Biology,** v.1, p.389-391, 1999.

KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Molecular Microbiology**, v.31, p.1229-1241, 1999.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D. J.; FREY, E. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell,** v.91, p.511-520, 1997.

KENNY, B.; FINLAY, B. B. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.7991-7995, 1995.

KENNY, B.; WARAWA, J. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. **Infection and Immunity**, v.69, p.1444-1453, 2001.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive Escherichia coli types. **Veterinary Microbiology**, v.106 p.87–95, 2005.

KOTLOWSKI, R.; BERNSTEIN, C. N.; SEPEHRI, S.; KRAUSE, D. O. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v.56, p.669–675, 2007.

KOZUB-WITKOWSKI, E.; KRAUSE, G.; FRANKEL, G.; KRAMER, D.; APPEL, B.; BEUTIN, L. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. **Journal of Applied Microbiology,** v.104, p.403-410, 2007.

LEOMIL, L.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; KRAUSE, G.; SCHMIDT, H.; BEUTIN, L. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. **FEMS Microbiology Letters**, v.249, p.335-342, 2005.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiology Reviews**, v.6, p.31-51, 1984.

MACHADO, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. Identification of ***Escherichia coli*** flagellar types by restriction of the amplified fliC gene. **Research in Microbiology,** v.151, p.535–546, 2000.

MAIRENA, E. C.; NEVES, B.C.; TRABULSI, L.R.; ELIAS, W.P. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Current Microbiology,** v.38, p.412–418, 2004.

MOURA, R.A.; SIRCILI, M.P.; LEOMIL, L.; MATTE´, M.H.; TRABULSI, L.R. ELIAS, W.P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Clonal Relationship among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Species and Humans. **Applied Environmental Microbiology,** v.75, p.7399–7408, 2009.

MUNDY, R.; JENKINS, C.; YU, J.; SMITH, H.; FRANKEL, G. Distribution of espI among clinical enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Journal of Medical Microbiology,** v.53, p.1145–1149, 2004.

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A.; IRINO, K.; DA SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, v.101, p.269–277, 2004.

NAKHJAVANI, F.A.; EMANEINI, M.; HOSSEINI, H.; IMAN-EINI, H.; ALIGHOLI, M.; JABALAMELI, F.; HAGHI-ASHTIANI, M.T.; TAHERIKALANI, M.; MIRSALEHIAN, A. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology,** v.62, p.191–195, 2013.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli.* **Clinical Microbiology Reviews***,* v.11, p.142-201, 1998.

NEWTON, H.J.; PEARSON, J.S.; BADEA, L.; KELLY, M.; LUCAS, M.; HOLLOWAY, G.; WAGSTAFF, K. M.; DUNSTONE, M. A.; SLOAN, J.; WHISSTOCK, J. C.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R. M.; JANS, D. A.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; COULSON, B. S.; HARTLAND, E. L. The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF-kB p65. **Plos Pathogens**, v.6, p.1-16, 2010.

NIELSEN, E. M.; ANDERSEN, M. T. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5_ nuclease PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.2884–2893, 2003.

NUNES, E. B.; SARIDAKIS, H. O.; IRINO, K.; PELAYO, J. S. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **Journal of Medical Microbiology,** v.52, p.499–504, 2003.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v.102, p.852-856, 2008.

OLIVEIRA, M.G.; BRITO, J.R.F; CARVALHO, R.R.; GUTH, B.E.C.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; KATO, M.A.M.F; RAMOS, I.I.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Identified as an Important Reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Brazil. **Applied Environmental Microbiology,** v.73, p.5945–5948, 2007.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; JANN, B.; JANN, K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of ***Escherichia coli***. **Bacteriology Review,** *v.*41, p.667–710, 1977**.**

ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. Serotyping of *Escherichia coli*. In: BERGAN, T. (Ed.). **Methods in Microbiology,** p.43-112, 1984.

OSWALD, E.; SCHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHES, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infection and Immunity,** v.68, p.64–71, 2000.

PABST, W. L.; ALTWEGG M.; KIND,C.; MIRJANIC, S.; HARDEGGER, D.; NADAL, D. Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* among Children with and without Diarrhea in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology,** v.41, p.2289-2293, 2003.

PATON, J.; PATON, A. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *E. coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 11, p. 450 - 479, 1998.

RAMACHANDRAN, V.; BRETT, K.; HORNITZKY, M. A.; DOWTON, M.; BETTELHEIM, K. A.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. Distribution of Intimin Subtypes among *Escherichia coli* Isolates from Ruminant and Human Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5022–5032, 2003.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease,** v.3, p.59-67, 2006.

ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.17, p.467-475, 2002.

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C. M.; MORELLI, A.; DE BATISTA, G. C. M. Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. **Journal of Clinical Microbiology,** v.42, p.398–400, 2004.

ROWE, B. The role of *Escherichia coli* in gastroenteritis. **Clinical Gastroenterology**, v.8, p.625-644, 1979.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases,** v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SCALETSKY, I. C.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L.; NUNES, C. R.; MARANHAO, H. S.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.645-648, 2002.

STEPHAN, R.; SCHUMACHER S. Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin–producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. **Letters in Applied Microbiology,** v.32, p.114–117, 2001.

TARR, C. L.; WHITTAM, S. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli.* **Journal of Bacteriology,** v.184, p.479–487, 2002.

THANABALASURIAR, A.; KOUTSOURIS, A.; WEFLEN, A.; MIMEE, M.; HECHT, G.; GRUENHEID, S.The bacterial virulence factor NleA is required for the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**, v.12, p.31-41, 2009.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Disease,** v.8, p.508–513, 2002.

VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology,** v.42, p.1787–1789, 2004.

VIDAL, M.; KRUGER, E.; DURAN, C.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V.; TORO, C.; VIDAL, R. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.5362-5365, 2005.

VIEIRA, M. A.M.; ANDRADE, J.R.C.; TRABULSI, L.R.; ROSA, A.C.P.; DIAS, A.M.G.; RAMOS, S.R.T.S.; FRANKEL, G.; GOMES, T.A.T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non–enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **Journal of Infection Disease,** v.183, p.762–772, 2001.

ZHANG, W. L.; KO¨ HLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SUERBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology,** v.40, p.4486–4492, 2002.

ZURAWSKI, D. V.; MUMY, K. L.; BADEA, L.; PRENTICE, J. A.; HARTLAND, E. L.; MCCORMICK, B. A.; MAURELLI, A. T. The NleE/OspZ Family of Effector Proteins Is Required for Polymorphonuclear Transepithelial Migration, a Characteristic Shared by Enteropathogenic *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* Infections. **Infection and Immunity**, v.76, p. 369–379, 2008.