

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

FILOGENIA E POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS
HÍBRIDOS DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENICA
ATÍPICA/ENTEROAGREGATIVA (aEPEC/EAEC) DO SOROTIPO
O3:H2 OBTIDOS DURANTE A INVESTIGAÇÃO DE UM SURTO
DE DIARREIA NO BRASIL

DAIANY RIBEIRO PAZ DE LIRA

ORIENTADOR: RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

CO-ORIENTADOR: LUIS FERNANDO DOS SANTOS

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

Rodrigo Tavanelli Hernandez

**BOTUCATU – SP
2022**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

FILOGENIA E POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS
HÍBRIDOS DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENICA
ATÍPICA/ENTEROAGREGATIVA (aEPEC/EAEC) DO SOROTIPO
O3:H2 OBTIDOS DURANTE A INVESTIGAÇÃO DE UM SURTO
DE DIARREIA NO BRASIL

DAIANY RIBEIRO PAZ DE LIRA

ORIENTADOR: RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

CO-ORIENTADOR: LUIS FERNANDO DOS SANTOS

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

Orientador: *Rodrigo Tavanelli Hernandez*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lira, Daiany Ribeiro Paz de.

Filogenia e potencial de virulência de isolados híbridos de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica/enteroagregativa (aEPEC/EAEC) do sorotipo O3 : H2 obtidos durante a investigação de um surto de diarreia no Brasil / Daiany Ribeiro Paz de Lira. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

Coorientador: Luis Fernando dos Santos

Capes: 21201021

1. *Escherichia coli* enteropatogênica. 2. Virulência (Microbiologia). 3. Diarreia. 4. Filogenia. 5. Surto de doenças.

Palavras-chave: Diarreia; Híbrido aEPEC/EAEC; Virulência.



“A única felicidade da vida está na consciência de ter realizado algo
útil em benefício da comunidade”.

- Vital Brazil

Dedicatória

Aos meus pais, Luiz e Claudia, por quem sou grata pelo apoio incondicional, incentivo, patrocínio, vocês foram fundamentais para a concretização de meus objetivos.

Às minhas irmãs, Anneelly, Noelly e Stephanny, pelos momentos mais descontraídos e divertidos.

Às minhas amigas Monique Herrera e Scarlet de Oliveira, que muito me apoiam e aconselharam, e estiveram presentes durante essa jornada, as quais sou grata, sem vocês essa trajetória não teria sido tão incrível.

Agradecimientos

Agradeço à Deus, por ter me iluminado e abençoado muito nessa missão.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes por me orientar, por acreditar em mim e me apoiar muito nesta trajetória. Obrigada pelos conselhos, que foram essenciais para o desenvolvimento desta dissertação e para minha formação, bem como, por incentivar com caráter e integridade minha capacidade de aprendizagem.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando dos Santos, quem cedeu gentilmente os isolados aqui investigados, os quais se mostraram mais interessantes do que aparentava.

À Prof^a Dr^a Vera Lucia Mores Rall por ter me aconselhado e por me ajudado bastante nessa etapa.

Ao Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior, pelos conselhos, ajudas prestadas, e pelas dicas as quais enriqueceram muito essa dissertação.

Ao Prof. Dr. Enéas de Carvalho, pela paciência e ensinamentos, suas colocações foram muito importantes para a concretização deste projeto.

À Prof^a Dr^a Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral, os meus sinceros agradecimentos, por toda ajuda indispensável, principalmente por ter me permitido fazer parte do temático e o estágio no seu laboratório.

À Prof^a Dr^a Ana Carolina de Mello Santos Gheller, pelas risadas e ensinamentos, contribuindo para o meu conhecimento científico, sou grata por fazer o estágio com você.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório LPB, Henrique Orsi, Iranildo Fernandes, Guilherme Frizzarin (Guiga), Guilherme Solveira (Camomila), Bruna Mendes, agradeço pelos momentos maravilhosos de bancadas e passeios, obrigada por tornar essa trajetória agradável e divertida, proporcionando, assim, maior rendimento em todos os planos.

Agradeço ainda a Regiane Dias, Melissa Vieira, Rodrigo Tanabe e Ivana Castilho por terem me ajudado muito no início e decorrer do mestrado, sanando várias de minhas dúvidas.

À todos os docentes, discentes e técnicos do IB, principalmente do Setor Microbiologia e Imunologia, que de alguma forma colaboraram na execução deste trabalho.

Agradeço às agências de fomento FAPESP (processo de número 2017/14821-7) pelo patrocínio do projeto temático e CAPES (88887.640984/2021-00) pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço a todos que me apoiaram, incentivaram e me ajudaram na concretização deste trabalho.

Resumo

RESUMO

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) e enteroagregativa (EAEC) são dois dos principais patótipos de *E. coli* diarreiogênica (ECD) causadores de doenças ao redor do mundo. A EPEC atípica (aEPEC) produz a lesão *attaching and effacing* nas células hospedeiras infectadas, levando ao acúmulo de F-actina e à formação de estruturas semelhantes a um pedestal sob as bactérias aderentes. A EAEC adere às células epiteliais formando um arranjo semelhante a tijolos empilhados, conhecido como padrão de aderência agregativa (AA), devido à produção de várias fímbrias de aderência agregativa (AAF/I-AAF/V). O objetivo do presente estudo foi investigar as características genotípicas e fenotípicas de isolados de *E. coli* híbridos de aEPEC/EAEC, pertencentes ao sorotipo O3:H2, bem como de isolados de aEPEC e EAEC do mesmo sorotipo, todos obtidos durante a investigação de um surto de diarreia, com o intuito de avaliar a influência da combinação de fatores de virulência na patogenicidade e melhor compreender a evolução desses híbridos. A partir de um surto de diarreia, foram obtidos um isolado de aEPEC (*eae*⁺/*bfpB*⁺), quatro EAEC (*aggR*⁺) e três híbridos de aEPEC/EAEC (*eae*⁺/*bfpB*⁺/*aggR*⁺), sendo todos os oito isolados do sorotipo O3:H2. Esses isolados foram caracterizados quanto à classificação dos filogrupos de *E. coli*, presença de genes codificadores de fatores de virulência associados à patogênese de EPEC e EAEC, análise do perfil plasmidial, padrão de aderência em células HeLa, formação de biofilme e teste de FAS (*fluorescent actin staining*). Todos os oito isolados estudados foram atribuídos ao filogrupo A. Observou-se que as EAEC e os híbridos de aEPEC/EAEC albergam vários genes do plasmídio de aderência agregativa (pAA), como *aatA*, *aap*, *orf3*, *aar*, *aggA* e *aggC* (codificando a pilina e o usher de AAF/I, respectivamente), além de apresentarem um plasmídio de alto peso molecular. Por outro lado, os isolados de aEPEC e os híbridos aEPEC/EAEC albergam dois genes cromossômicos, *nleC* e *nleF*, que codificam efetores secretados pelo sistema de secreção tipo 3. Juntos, esses dados sugerem que o *background* de aEPEC deve ter servido como um receptor para o pAA, originando assim os isolados híbridos de aEPEC/EAEC. As EAEC e os híbridos aEPEC/EAEC produziram o padrão AA, enquanto a aEPEC aderiu esporadicamente às células epiteliais. Conforme observado no ensaio de FAS, a aEPEC foi incapaz de promover o acúmulo de F-actina sob as bactérias aderentes, enquanto os híbridos aEPEC/EAEC foram FAS-positivos. Diferentemente do isolado de aEPEC, os quatro isolados de EAEC e os três híbridos de aEPEC/EAEC produziram biofilme na superfície abiótica, apontando a influência do pAA para o estabelecimento deste fenótipo. Esse estudo revelou a alta plasticidade da *E. coli* patogênica do sorotipo O3:H2 na aquisição e manutenção de genes que codificam a virulência. No entanto, a busca por novos híbridos é continuamente necessária para melhor entender quais eventos estão envolvidos no surgimento desses híbridos e como diferentes combinações genéticas podem influenciar sua patogenicidade.

Palavras-chave: híbrido aEPEC/EAEC, diarreia, virulência.

ABSTRACT

Enteropathogenic (EPEC) and enteroaggregative (EAEC) *Escherichia coli* are two of the major pathotypes of diarrheagenic *E. coli* (DEC) causing disease worldwide. Atypical EPEC (aEPEC) produces the attaching and effacing lesion in infected host cells, leading to the accumulation of F-actin and the formation of pedestal-like structures underneath adherent bacteria. EAEC adheres on epithelial cells forming an arrangement that resembles stacked bricks, known as aggregative adherence (AA) pattern, due to the production of several aggregative adherence fimbriae (AAF/I – AAF/V). The main goal of the present study was to investigate the genotypic and phenotypic features hybrid aEPEC/EAEC, belonging to the O3:H2 serotype, as well as of aEPEC and EAEC isolates of the same serotype, all of them obtained during an diarrheal outbreak investigation, in order to evaluate the influence of the virulence factors combinations on their pathogenicity, and better understand the emergence of these hybrids. Recently, we reported a diarrheal outbreak investigation, in which we obtained one aEPEC (*eae*⁺/*bfpB*⁻), four EAEC (*aggR*⁺), and three hybrid aEPEC/EAEC (*eae*⁺/*bfpB*⁻/*aggR*⁺), with all eight isolates assigned in the serotype O3:H2. Here we attempted to characterize these isolates in terms of *E. coli* phylogroup classification, presence of virulence factor-encoding genes, associated with the pathogenesis of EPEC and EAEC, plasmidial profile, adherence pattern on HeLa cells, FAS (fluorescent actin staining) test and biofilm formation. All eight isolates studied were assigned in the phylogroup A. We observed that the EAEC and the hybrid aEPEC/EAEC harbored several genes from the aggregative adherence plasmid (pAA), such as *aatA*, *aap*, *orf3*, *aar*, *aggA* and *aggC* (encoding the pilin and usher of AAF/I, respectively) and share a common high molecular weight plasmid. On the other hand, the aEPEC and the hybrid aEPEC/EAEC isolates harbored two chromosomal genes, *nleC* and *nleF*, encoding for type 3 secreted effectors. Together, these data may suggest that the aEPEC background must have served as a receptor for the pAA, thus originating the hybrid aEPEC/EAEC isolates. The EAEC and the hybrid aEPEC/EAEC produced the AA pattern, while the aEPEC adhered only sporadically to the epithelial cells. As observed in the FAS assay, the aEPEC was unable to promote F-actin accumulation underneath adherent bacteria, while the hybrids aEPEC/EAEC were FAS-positive. Distinct from the aEPEC isolate, the four EAEC and the three hybrid aEPEC/EAEC produced biofilm on abiotic surface, thus pointing out the influence of the pAA for the establishment of this phenotype. Our study reveals the high plasticity of pathogenic *E. coli* of serotype O3:H2 in acquiring and maintaining virulence-encoding genes. However, the search for new hybrids is continually needed to better understand which events are involved in the emergence of these hybrids and how different genetic combinations can influence their pathogenicity.

Keywords: hybrid aEPEC/EAEC, diarrhea, virulence.

Sumário

Sumário

Revisão bibliográfica.....	1
Referências.....	8
Capítulo 1.....	18
Identification of a Hybrid atypical enteropathogenic and enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> (aEPEC/EAEC) clone of serotype O3:H2 associated with a diarrheal outbreak in Brazil.....	19
References.....	21
Capítulo 2.....	24
Caracterização molecular e fenotípica de isolados de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica atípica (aEPEC), enteroagregativa (EAEC) e híbridos aEPEC/EAEC do sorotipo O3:H2.....	25
Resumo.....	26
Abstract.....	27
1. Introdução.....	28
2. Material e métodos.....	30
2.1. Isolados de aEPEC, EAEC e híbridos de aEPEC/EAEC do sorotipo O3:H2 estudados.....	30
2.2 Identificação do grupo filogenético.....	30
2.3 Identificação de marcadores de virulência associados aos patotipos de EPEC e EAEC nos isolados de <i>E. coli</i> do sorotipo O3:H2 estudados.....	31
2.4 Avaliação do perfil plasmidial.....	39
2.5 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica.....	40
2.6 Teste de identificação da polimerização de actina.....	40
2.7 Determinação da via de indução da lesão AE: Tir-Nck e Tir-TccP/EspF _U	42
3. Resultados.....	44
4. Discussão.....	51
5. Referências.....	54
Conclusão.....	38

Revisão Bibliográfica

Revisão Bibliográfica

A diarreia é um grave problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento, sendo a segunda causa mais importante de mortalidade entre crianças menores de cinco anos de idade (KOTLOFF *et al.*, 2013; WHO, 2017). Entre os principais agentes etiológicos da doença diarreica estão os vírus (rotavírus, adenovírus, norovírus, sapovírus e astrovírus), parasitas (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium spp*) e bactérias (*Shigella spp*, *Salmonella ssp*, *Campylobacter spp*, *Aeromonas spp*, *Vibrio spp* e *Escherichia coli*), sendo os isolados de *E. coli* causadores de diarreia denominados *Escherichia coli* diarreiogênica (ECD) (CROXEN *et al.*, 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KOTLOFF *et al.*, 2013; LANATA *et al.*, 2013; NATARO; KAPER, 1998).

Os isolados de ECD são tradicionalmente categorizadas em seis patotipos de acordo com suas características de virulência, doenças que causam e pelo fenótipo de interação apresentado em células eucarióticas (HeLa ou Hep-2) cultivadas *in vitro* (NATARO; KAPER, 1998). Os seis patotipos de ECD são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* que aderem difusamente (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Segundo o *Global Enteric Multicenter Study* (GEMS), EPEC foi o principal agente etiológico da diarreia em crianças menores de um ano de idade em países em desenvolvimento, principalmente países africanos e asiáticos (KOTLOFF *et al.*, 2013). A EPEC é caracterizada por induzir uma lesão histopatológica nos enterócitos, denominada lesão *attaching-and-effacing* (AE), não produzir a toxina de Shiga (Stx) e as enterotoxinas termo-lábeis (ST) e termo-estáveis (LT), sintetizada por isolados de STEC e ETEC, respectivamente (NATARO; KAPER, 1998). A lesão AE provoca a destruição das microvilosidades, a adesão íntima da bactéria a célula eucariótica e induz a formação de uma estrutura, rica em F-actina e outros elementos do citoesqueleto, que se assemelha a um pedestal (MOON *et al.*, 1983), sendo mediada por várias proteínas que são codificadas por genes agrupados em uma ilha de patogenicidade (PAI), denominada *locus of enterocyte effacement* ou região LEE (MCDANIEL *et al.*, 1995), onde encontram-se os genes que codificam o Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3), proteínas secretadas que formam o translocon do SST3 (*EPEC-secreted proteins*), tais como EspA, EspB e EspD, proteínas efetoras (Map, EspF, EspG, EspH e EspZ), a adesina intimina, codificada pelo gene *eae*, e o receptor Tir, que é translocado para a célula hospedeira pelo SST3 e atua como receptor para a adesina intimina, além de genes responsáveis

por codificar proteínas reguladoras (Ler, GrlA, GrlR) e chaperonas (CesT, CesD, CesAB) (CHEN; FRANKEL, 2005; JARVIS *et al.*, 1995; JERSE *et al.*, 1990; KENNY *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 2011). Variações na sequência de nucleotídeos da região do gene *eae*, responsável por codificar a porção C-terminal da adesina intimina, permitiram a subtipagem desse gene em pelo menos 35 subtipos distintos. Essa subtipagem é uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos e filogenéticos dos isolados de EPEC (HAZEN *et al.*, 2013; INGLE *et al.*, 2016; MORA *et al.*, 2009).

Há duas vias de indução da lesão AE. Na primeira via, a interação Tir-Intimina provoca a fosforilação do resíduo de tirosina 474 do domínio C-terminal de Tir, que apresenta sítio de ligação para as proteínas adaptadoras Nck presentes nas células do hospedeiro. Subsequentemente a essa interação, ocorre o recrutamento e ativação da proteína N-WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome neural*), iniciando a polimerização da actina através da ativação do complexo proteico Arp2/3 (*Actin related protein 2/3*), o que promove a formação do pedestal (DEVINNEY *et al.*, 2001; KENNY, 1999). Diferentemente, na segunda via também realizada por alguns isolados STEC LEE⁺, é utilizada a proteína TccP (*Tir-cytoskeleton coupling protein*) (GARMENDIA *et al.*, 2004), também denominada EspF_U (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004) ao invés de Nck. Após ser translocada, TccP/EspF_U liga-se diretamente e ativa N-WASP, acarretando na polimerização de actina e consequente formação de pedestal (GARMENDIA *et al.*, 2004).

Além da região LEE, outras PAIs têm sido encontradas no cromossomo de bactérias capazes de induzir a lesão AE (IGUCHI *et al.*, 2009; PERNA *et al.*, 2001; PETTY *et al.*, 2010). Essas proteínas são atualmente conhecidas como efetores não-LEE e, estudos de virulência têm identificado a capacidade desses efetores de subverter vários processos relacionados às células hospedeiras, como a inibição do transporte de proteínas pelo retículo endoplasmático (EspI), da resposta pro-inflamatória (NleB, NleC, NleD e NleE) e a fagocitose (NleF), além de bloquear o ciclo celular (Cif) e ativar Cdc42 e Rac1 para induzir a formação de *ruffle* de membrana e lamelipódio (EspT) (VOSENKÄMPER; MACDONALD; MARCHÈS, 2011; WONG *et al.*, 2011). Outro efector não-LEE denominado Ibe (*IQGAP1-binding effector*) foi identificado em uma amostra de EPEC pertencente ao sorotipo O8:H⁻, e mostrou participar da formação da lesão AE, embora a sua exata contribuição ainda não se encontre perfeitamente esclarecida (BUSS *et al.*, 2009). Os genes que codificam as proteínas efectoras NleB e NleD, bem como o gene *sen* (que codifica uma enterotoxina inicialmente descrita em *Shigella flexneri*) estão localizados no módulo 2 da PAI-OI122 (KARMALI *et al.*, 2003). Essa PAI ainda apresenta outros dois módulos, que assim como o módulo 2, também albergam genes de virulência, como: *katP*

(módulo 1) e *efa1/lifA* (módulo 3). Estudos têm demonstrado a associação da PAI-OI122 completa, *i.e.*, carregando genes de virulência dos três módulos, bem como de genes individuais dessa ilha com a doença diarreia (AFSET *et al.*, 2006; MERCADO *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2010); reforçando assim, a importância dessa PAI na patogênese de EPEC.

A EPEC é dividida em típica (tEPEC) e atípica (aEPEC) com base na presença ou ausência do plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor* - pEAF) (KAPER, 1996; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). As tEPEC possuem o pEAF que alberga os genes que codificam a fímbria do tipo IV denominada *bundle-forming pilus* (BFP), produzindo o fenótipo de adesão localizada (AL) nas células epiteliais (DONNENBERG *et al.*, 1992; SCALETISKY; SILVA; TRABULSI, 1984). O padrão AL é caracterizado pela formação de microcolônias compactas na superfície das células epiteliais, após 3 horas de interação entre bactéria-célula. Por outro lado, as aEPEC podem ou não aderir as células eucarióticas, sendo o padrão de aderência localizada-like (ALL), caracterizado pela formação de microcolônias frouxas nas superfícies das células epiteliais após períodos mais prolongados de infecção (RODRIGUES *et al.*, 1996), o mais comumente observado (ABE *et al.*, 2009; SCALETISKY *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2019). Esporadicamente, alguns isolados de aEPEC podem aderir às células epiteliais em padrões característicos de outros patótipos de ECD, tais como os padrões difuso (AD) e agregativo (AA), que são marcadores fenotípicos dos patótipos DAEC e EAEC, respectivamente (ABE *et al.*, 2009; DULGUER *et al.*, 2003; VIEIRA, *et al.*, 2001).

Uma vez que aEPEC não são capazes de produzir BFP, outras estruturas bacterianas têm sido implicadas na capacidade desses isolados em interagir com as células hospedeiras. Entre essas estruturas de aderência, algumas se destacam pela sua alta prevalência entre os isolados de aEPEC, ou pela sua associação com a doença diarreica (AFSET *et al.*, 2006; HERNANDES *et al.*, 2011; SCALETISKY *et al.*, 2009). São exemplos dessas adesinas: Paa (*Porcine AE-associated adhesin*), Iha (*IrgA homologue adhesion*), Efa1/LifA (*EHEC factor for adherence*), ECP (*E. coli common pilus*), HCP (*Hemorrhagic coli pilus*), e LPF (*Long Polar Fimbriae*) (GOMES *et al.*, 2011; MUNHOZ *et al.*, 2018; SCALETISKY *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2016). Além de genes responsáveis por codificar adesinas e proteínas efetoras, que são translocadas para a célula hospedeira pelo SST3, os isolados de aEPEC também albergam genes responsáveis por codificar toxinas que foram originalmente caracterizados em outros patótipos de ECD, tais como os genes: *astA*, *cdt*, *ehxA*, *espP*, *espC*, *espI*, *pic* e *pet* (ABREU *et al.*, 2013; SCALETISKY *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2016).

EAEC é um agente etiológico responsável por surtos de diarreia em diversos países como Coréia do Sul, Inglaterra e Japão (DALLMAN *et al.*, 2014; ITOH *et al.*, 1997; SHIN *et*

et al., 2015) além de ser um dos patótipos de ECD mais prevalentes em casos esporádicos de diarreia, principalmente entre crianças de até cinco anos de idade (ARAUJO *et al.*, 2007; BUERIS *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2006; IJIMA *et al.*, 2017; ORI *et al.*, 2019). Esse patótipo também tem sido associada a casos de diarreia persistente, com duração igual ou superior a 14 dias (BHATNAGAR *et al.*, 1993; OKEKE *et al.*, 2000), e infecções assintomáticas têm sido associadas a casos de desnutrição, especialmente entre crianças vivendo em países emergentes (HAVT *et al.*, 2017).

O patótipo EAEC é caracterizado por produzir o padrão AA, aonde as bactérias se organizam em um arranjo que se assemelha a tijolos empilhados, ocorrendo tanto na superfície das células epiteliais (HEp-2 ou HeLa), como em superfícies abióticas (NATARO *et al.*, 1987). A EAEC causa diarreia nos pacientes infectados devido a sua capacidade de adesão, formação de biofilme, liberação de toxinas e inflamação da mucosa intestinal (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012), culminando em um quadro clínico de diarreia secretória (NATARO; KAPER, 1998).

Até o momento, cinco adesinas fimbriais, denominadas *aggregative adherence fimbriae* (AAF/I-AAF/V), já foram descritas como sendo responsáveis pelo estabelecimento do padrão AA (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUENEC, 2002; BOISEN *et al.*, 2008; CZEZULIN *et al.*, 1999; JØNSSON *et al.*, 2015; NATARO *et al.*, 1992), além de adesinas afimbriais, tais como a proteína de membrana externa Ap58 e a hemoaglutinina Hra1 (BHARGAVA *et al.*, 2009; MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003). Os genes responsáveis por codificar as proteínas associadas à biogênese das AAFs encontram-se localizados em um plasmídeo de alto peso molecular conhecido como pAA (CZEZULIN *et al.*, 1999). Enquanto os genes que codificam as fímbrias AAF/I, AAF/III, AAF/IV e AAF/V encontram-se organizados em um único operon, como por exemplo, o operon *aggDCBA* que codifica a AAF/I (SAVARINO *et al.*, 1994), os genes responsáveis por codificar a AAF/II estão divididos em duas regiões distintas: região 1, contendo os genes *aafD* e *aafA*, e região 2, contendo os genes *aafB* e *aafC* (ELIAS *et al.*, 1999). Recentemente, uma fímbria do tipo IV, denominada *aggregate-forming pili* (AFP), foi identificada no isolado híbrido STEC/EAEC do sorotipo O23:H8. O operon *afp*, que alberga os genes responsáveis por codificar as proteínas envolvidas na biogênese de AFP, está localizado em um plasmídeo, assim como o gene *afpR* que codifica uma proteína reguladora (LANG *et al.*, 2018). Os genes do operon *afp* e o gene *afpR* foram detectados em isolados de EAEC atípica (*aggR*⁻) (DIAS *et al.*, 2020), bem como foi identificado em um isolado que causou infecção do trato urinário, do sorotipo O166:H12, híbrido de *E. coli* uropatogênica e EAEC atípica (SCHÜROFF *et al.*, 2021).

Após a identificação da primeira fímbria associada ao fenótipo AA (NATARO *et al.*, 1992), estudos posteriores caracterizando o conjunto de genes necessários para a biogênese de AAF/I, revelaram que a produção dessa fímbria é dependente de duas regiões distintas do pAA, que foram designadas regiões 1 e 2, separadas por aproximadamente 9 kilobases (NATARO *et al.*, 1993). A análise da sequência de nucleotídeos da região-1 do pAA revelou a existência de 4 ORFs (*Open reading frames*) que foram denominadas *aggDCBA* (SAVARINO *et al.*, 1994), enquanto a região-2 apresentou uma ORF, de 794 pares de bases, responsável por codificar uma proteína de aproximadamente 29,4 KDa, designada AggR, que apresenta alta identidade na sequência de aminoácidos com reguladores transcricionais da família AraC (NATARO *et al.*, 1994). Um estudo posterior, realizado com o isolado de EAEC 042, demonstrou que além de ativar a expressão de genes plasmídiais, o regulador AggR também é capaz de ativar a transcrição de genes cromossomais, como por exemplo, dos genes localizados no operon *aaiA–Y*, responsável por codificar um sistema de secreção do tipo 6 (SST6) (DUDLEY *et al.*, 2006; HÜTTENER *et al.*, 2018; MORIN *et al.*, 2010; PRIETO *et al.*, 2021). Muito embora a participação do SST6 na patogênese de EAEC ainda não seja completamente conhecida, um estudo identificou uma toxina secretada por esse sistema, denominada Tle1, com atividade fosfolipásica atuando na eliminação de bactérias concorrentes (FLAUGNATTI *et al.*, 2016). Kaper e colaboradores sugeriram que os isolados de EAEC fossem divididos em dois grupos: EAEC típica e EAEC atípica, com base na presença do gene *aggR* em EAEC típica, e ausência desse gene na EAEC atípica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Posteriormente à colonização, EAEC sintetiza e secreta várias enterotoxinas responsáveis por induzir efeitos citotóxicos nos enterócitos e a inflamação da mucosa intestinal (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Entre essas toxinas pode-se destacar a EAST-1 (*enteroaggregative heat-stable toxin-1*), ShET1 (enterotoxina-1 de *Shigella*), Pet (*plasmid-encoded toxin*) e SigA (*Shigella* IgA-like protease homologue gene), codificadas por genes plasmidiais, além de Pic (*protein involved in colonization*) e SepA (*Shigella extracellular protease*) codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano (FASANO *et al.*, 1997; HENDERSON *et al.*, 1999; SAVARINO *et al.*, 1991, 1993).

A enterotoxina EAST-1, codificada pelo gene *astA* que está localizado no pAA, foi originalmente identificada no isolado de EAEC 17-2. O gene *astA* já foi encontrado em outros patótipos de ECD, como EPEC e em isolados de *E. coli* não patogênica (CZECZULIN *et al.*, 1999; DULGUER *et al.*, 2003; SAVARINO *et al.*, 1996), dificultando assim, a compreensão do papel dessa toxina no estabelecimento da doença diarreica (SCALETSKY *et al.*, 2009). Experimentos *in vitro* utilizando íleo de coelho submetido a filtrados bacterianos de um isolado

de EAEC 17-2 (*astA*⁺) mostrou o aumento dos níveis de GMP cíclico, acarretando uma modificação do fluxo de íons que resulta em uma resposta secretória (SAVARINO *et al.*, 1993). No entanto, um estudo posterior demonstrou que a enterotoxina EAST-1 não causou diarreia em porcos gnotobióticos de cinco dias de idade (RUAN *et al.*, 2012), apesar da existência de relatos de surtos de diarreia causados por *E. coli* desprovida de marcadores de ECD, mas portadoras do gene *astA* (OCHI *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2002). A enterotoxina ShET1 é codificada por um gene cromossomal, e classificada como toxina do tipo A:B, a qual gera acúmulo de fluido em alça ileal de coelho (FASANO *et al.*, 1997).

Pet, Pic, SigA e SepA são citotoxinas pertencentes à classe das SPATEs (*serine protease autotransporters Enterobacteriaceae*), que compreendem serino proteases cujo sítio ativo contém a tríade catalítica Ser/His/Asp, no qual o resíduo serina realiza um ataque nucleofílico das ligações peptídicas (PAGE; DI CERA, 2008). As SPATEs são secretadas pelo sistema de secreção tipo V, também conhecido como sistema autotransportador, subtipo Va, (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011) e que podem desempenhar várias funções na patogênese das enterobactérias, tais como aderência, invasão, citotoxicidade, resistência à atividade bactericida do soro e formação de biofilme (DUTTA *et al.*, 2002; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011); Pet tem a capacidade de modificar o citoesqueleto dos enterócitos de forma a promover o arredondamento e descolamento celular, além de provocar a degradação da α -fodrina, uma proteína presente na membrana das células eucarióticas (NAVARRO-GARCIA *et al.*, 1998). Pic induz hipersecreção de muco, apresenta atividade mucolítica e contribui para a colonização da mucosa por EAEC (NAVARRO-GARCIA *et al.*, 2010).

O plasmídeo pAA, além de albergar os fatores de colonização já citados, também alberga o gene *aap*, regulado pelo AggR, que codifica uma proteína secretada de baixa massa molecular, denominada dispersina. A dispersina promove a dispersão de EAEC na mucosa intestinal a fim de estabelecer novos focos de infecção, a partir da neutralização parcial da agregação mediada pelas AAFs (CHAUDHURI *et al.*, 2010; SHEIKH *et al.*, 2002). A secreção da dispersina é translocada através de um sistema chamado transportador EAEC ABC (*aat*), codificado por *aatPABCD* (NISHI *et al.*, 2003). Estudos recentes mostraram forte associação de *aap* e *aatA*, que codificam a dispersina e seu translocador Aat, com EAEC na patogênese de diarreia (ESTRADA-GARCIA *et al.*, 2005; PATZI-VARGAS *et al.*, 2015).

Após o surto de diarreia ocorrido na Alemanha, durante o ano de 2011, devido a infecções por um isolado híbrido de STEC/EAEC (*aatA*⁺/*aggR*⁺/*stx2*⁺) do sorotipo O104:H4, aonde foram registrados 3.816 casos de diarreia, 845 casos de síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e 54 óbitos (KAPER; O'BRIEN, 2014; KARCH *et al.*, 2012; WERBER *et al.*, 2012), a

ocorrência de isolados híbridos albergando concomitantemente fatores de virulência característicos de mais de um patotipo de ECD e/ou de *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) tem despertado grande interesse. Até o momento, pode-se evidenciar na literatura relatos de isolados híbridos entéricos de STEC/EAEC, de sorotipos distintos do sorotipo O104:H4, tais como O59:H[19] e OR:H[8] (PRAGER *et al.*, 2014), EPEC/ETEC (HAZEN *et al.*, 2017) e STEC/ETEC (BAI *et al.*, 2019; CAVALCANTI *et al.*, 2020; NYHOLM *et al.*, 2015).

Considerando-se a literatura consultada, existem apenas dois relatos na literatura descrevendo isolados híbridos de aEPEC/EAEC pertencentes aos sorotipos O142: H34 e O158:H⁻, ambos provenientes de pacientes com diarreia (GHILARDI *et al.*, 2003; LIEBCHEN *et al.*, 2011). No entanto, estudos adicionais caracterizando essas amostras não foram realizadas.

Durante o ano de 2010, no serviço de vigilância epidemiológica realizado pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, foram identificados isolados do sorotipo O3:H2 albergando concomitantemente marcadores de aEPEC (*escN*⁺/*bfpB*⁻) e EAEC (*aatA*⁺/*aggR*⁺). Esses isolados híbridos (aEPEC/EAEC) foram obtidos durante a investigação de um surto de diarreia ocorrido na cidade de Sorocaba/SP. Além disso, isolados de EAEC e aEPEC do sorotipo O3:H2 obtidos durante a investigação do referido surto também foram analisados. Uma vez que a combinação de fatores de virulência poderia culminar no surgimento de amostras potencialmente mais patogênicas, a caracterização do híbrido aEPEC/EAEC, associado a um possível surto de diarreia, poderia ajudar na compreensão das estratégias envolvidas no surgimento de novos híbridos, bem como, no potencial dessas amostras em causar doenças no hospedeiro humano.

Referências

- ABE, C. M. *et al.* Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*⁺ EAF-negative *stx*⁻ genetic profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 357–365, ago. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.025>>.
- ABREU, A. G. *et al.* Autotransporter Protein-Encoding Genes of Diarrheagenic *Escherichia coli* Are Found in both Typical and Atypical Enteropathogenic *E. coli* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 411–414, 1 jan. 2013. Disponível em: <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02635-12>>.
- AFSET, J. E. *et al.* 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, n. 10, p. 3703–3711, 1 out. 2006. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00429-06>>.

ARAUJO, J. M. *et al.* 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, n. 10, p. 3396–3399, 1 out. 2007. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00084-07>>.

BAI, X. *et al.* Molecular Characterization and Comparative Genomics of Clinical Hybrid Shiga Toxin-Producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC / ETEC) **Strains in Sweden. Scientific Reports**, n. January, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42122-z>>.

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, 1 ago. 2002. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.70.8.4302-4311.2002>>.

BHARGAVA, S. *et al.* Heat-Resistant Agglutinin 1 Is an Accessory Enteroaggregative *Escherichia coli* Colonization Factor. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 15, p. 4934–4942, 1 ago. 2009. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01831-08>>.

BHATNAGAR, S. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a New Pathogen Causing Acute and Persistent Diarrhea. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 579–583, 8 jan. 1993. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365549309008546>>.

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, 1 jul. 2008. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01646-07>>.

BRYCE, J. *et al.* WHO estimates of the causes of death in children. **The Lancet**, v. 365, n. 9465, p. 1147–1152, mar. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605718778>>.

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, 30 out. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762007000700009&lng=en&tlng=en>.

BUSS, C. *et al.* Identification and characterization of Ibe, a novel type III effector protein of A/E pathogens targeting human IQGAP1. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 661–677, abr. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2009.01284.x>>.

CAMPELLONE, K. G.; ROBBINS, D.; LEONG, J. M. EspF_U is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. **Developmental Cell**, v. 7, n. 2, p. 217–228, 2004.

CAVALCANTI *et al.* Virulence Profiling and Molecular Typing of Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) from Human Sources in Brazil. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 171, 25 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/2/171>>.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>>.

Acesso em 08 abr. 2021.

CHAUDHURI, R. R. *et al.* Complete Genome Sequence and Comparative Metabolic Profiling of the Prototypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain 042. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8801, 20 jan. 2010. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008801>>.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: Unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–98, 2005.

CROXEN, M. A. *et al.* Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 1 out. 2013. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00022-13>>.

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 Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Cases Associated with a Large Multi-Pathogen Foodborne Outbreak in the UK. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e98103, 20 maio 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0098103>>.

DEVINNEY, R. *et al.* Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 1445–1458, set. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2001.02617.x>>.

DIAS, R. C. B. *et al.* Analysis of the Virulence Profile and Phenotypic Features of Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (EAEC) Isolated From Diarrheal Patients in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. April, p. 1–10, 22 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00144/full>>.

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

DUDLEY, E. G. *et al.* Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1267–1282, set. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05281.x>>.

DULGUER, M. V. *et al.* Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains: Phenotypic and Genetic Profiling Reveals a Strong Association between Enteropathogenic *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin and Diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 11, p. 1685–1694, dez. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/379666>>.

DUTTA, P. R. *et al.* Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7105–7113, 1 dez. 2002. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.70.12.7105-7113.2002>>.

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, 1 jun. 1999. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-48-6-597>>.

ESTRADA-GARCÍA, T. *et al.* Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1306–1308, ago. 2005. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/8/05-0192_article.htm>.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 281–298, dez. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2012.01008.x>>.

FASANO, A. *et al.* Effect of shigella enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine *in vitro* and *in vivo*. **Gut**, v. 40, n. 4, p. 505–511, 1 abr. 1997. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.40.4.505>>.

FLAUGNATTI, N. *et al.* A phospholipase A 1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. **Molecular Microbiology**, v. 99, n. 6, p. 1099–1118, mar. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/mmi.13292>>.

GARMENDIA, J. *et al.* TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton⁺. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1167–1183, dez. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2004.00459.x>>.

GHILARDI, A. C. R. *et al.* Virulence factors of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O127 and O142. **Epidemiology and Infection**, v. 131, n. 2, p. 815–821, 7 out. 2003. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S095026880300877X/type/journal_article>.

GOMES, T. A. T. *et al.* Adhesin-Encoding Genes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Are More Prevalent in Atypical than in Typical Enteropathogenic *E. coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3334–3337, set. 2011. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00779-11>>.

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, out. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.024>>.

HAZEN, T. H. *et al.* Comparative genomics and transcriptomics of *Escherichia coli* isolates carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3513, 14 dez. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-03489-z>>.

HAZEN, T. H. *et al.* Refining the pathovar paradigm via phylogenomics of the attaching and effacing *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 31,

p. 12810–12815, 30 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1306836110>>.

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.

HERNANDES, R. T. *et al.* Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8391–8399, 1 dez. 2011. Disponível em: <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.05376-11>>.

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, 1 set. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/505869>>.

HÜTTENER, M. *et al.* Stringent Response and AggR-Dependent Virulence Regulation in the Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain 042. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–9, 10 abr. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00717/full>>.

IGUCHI, A. *et al.* Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 Strain E2348/69. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 1, p. 347–354, 1 jan. 2009. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01238-08>>.

IJIMA, Y. *et al.* High Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* among Children with Diarrhea in Kenya. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 70, n. 1, p. 80–83, 2017. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/70/1/70_JJID.2016.064/_article>.

INGLE, D. J. *et al.* Evolution of atypical enteropathogenic *E. coli* by repeated acquisition of LEE pathogenicity island variants. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 15010, 18 fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.10>>.

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.

JARVIS, K. G. *et al.* 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, n. 17, p. 7996–8000, 15 ago. 1995. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.92.17.7996>>.

JERSE, A. E. *et al.* A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, n. October, p. 7839–7843, 1990.

JØNSSON, R. *et al.* Novel Aggregative Adherence Fimbria Variant of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1396–1405, abr. 2015. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.02820-14>>.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro818>>.

KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. Overview and Historical Perspectives. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 6, p. 1–5, 10 dez. 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9343-8_1>.

KAPER, J. P. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 130–133, 1996.

KARCH, H. *et al.* The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 9, p. 841–848, 24 set. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/emmm.201201662>>.

KARMALI, M. A. A. *et al.* Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 4930–4940, 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/379726>>.

KENNY, B. *et al.* Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511–520, nov. 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400804377>>.

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, n. 4, p. 1229–1241, fev. 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1999.01265.x>>.

KOTLOFF, K. L. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209–222, jul. 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)>.

LANATA, C. F. *et al.* Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72788, 4 set. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0072788>>.

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, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0209-8>>.

LIEBCHEN, A. *et al.* Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Diarrhea in São Paulo, Brazil: Identification of Intermediate Virulence Factor Profiles by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2274–2278, jun. 2011. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00386-11>>.

MCDANIEL, T. K. *et al.* A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. February, p. 1664–1668, 1995.

MERCADO, E. H. *et al.* Pathogenicity Island O-122 in enteropathogenic *Escherichia coli* strains is associated with diarrhea severity in children from Lima Peru. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 4, p. 231–236, jun. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422116300595>>.

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, ago. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-5822.2003.00299.x>>.

MOON, H. W. *et al.* Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in Pig and Rabbit Intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340–1351, 1983.

MORA, A. *et al.* HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. **International Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 243–251, 2009.

MORIN, N. *et al.* Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 344–355, abr. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2009.00645.x>>.

MUNHOZ, D. D. *et al.* Distribution of Major Pilin Subunit Genes Among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Influence of Growth Media on Expression of the *ecp* Operon. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–10, 15 maio 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00942/full>>.

NATARO, J. P. *et al.* Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 3, p. 1126–1131, 1993.

NATARO, J. P; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=121379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

NATARO, JAMES P. *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatric Infectious Disease Journal**. [S.l: s.n.], , 1987

NATARO, JAMES 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.

NATARO, JAMES 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.

NAVARRO-GARCIA, F. *et al.* Pic, an Autotransporter Protein Secreted by Different Pathogens in the Enterobacteriaceae Family, Is a Potent Mucus Secretagogue. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 10, p. 4101–4109, 1 out. 2010. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.00523-10>>.

NAVARRO-GARCÍA, 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.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, n. 1, p. 13–24, 27 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/gmic.2.1.14933>>.

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, 14 nov. 2003. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M306413200>>.

NYHOLM, O. *et al.* Hybrids of Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Among Human and Animal Isolates in Finland. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 7, p. 518–524, nov. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/zph.12177>>.

OCHI, S. *et al.* An Outbreak of Diarrhea in Mandera, Kenya, Due to *Escherichia coli* Serogroup O-Nontypable Strain That Had a Coding Gene for Enteroaggregative *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 2, p. 457–464, 8 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/lookup/doi/10.4269/ajtmh.16-0310>>.

OKEKE, I. N. *et al.* Heterogeneous Virulence of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Children in Southwest Nigeria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 252–260, jan. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315204>>.

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, n. e10, p. e10, 19 set. 2019. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268818002595/type/journal_article>.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7–8, p. 1220–1236, 9 abr. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-008-7565-9>>.

PATZI-VARGAS, S. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003510, 4 mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003510>>.

PERNA, N. T. *et al.* Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, n. January, p. 529–533, 2001.

PETTY, N. K. *et al.* The *Citrobacter rodentium* Genome Sequence Reveals Convergent Evolution with Human Pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 525–538, 15 jan. 2010. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01144-09>>.

PRAGER, R. *et al.* Two Novel EHEC/EAEC Hybrid Strains Isolated from Human Infections. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95379, 21 abr. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095379>>.

PRIETO, A. *et al.* Modulation of AggR levels reveals features of virulence regulation in enteroaggregative *E. coli*. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1295, 16 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s42003-021-02820-9>>.

RODRIGUES, J. *et al.* Clonal Structure and Virulence Factors in Strains of *Escherichia coli* of the Classic Serogroup O55. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2680–2686, 1996.

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, p. e43203, 15 ago. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043203>>.

SAVARINO, S. J. *et al.* Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. **Journal of Bacteriology**, 1994.

SAVARINO, STEPHEN 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, 1 abr. 1991. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/115151>>.

SAVARINO, STEPHEN J. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 7, p. 3093–3097, 1 abr. 1993. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.90.7.3093>>.

SAVARINO, STEPHEN J. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin Is Not Restricted to Enteroaggregative *E. coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 4, p. 1019–1022, 1 abr. 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/173.4.1019>>.

SCALETISKY, I. C. A. *et al.* Evidence of Pathogenic Subgroups among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3756–3759, 1 nov. 2009. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01599-09>>.

SCALETISKY, ISABEL C A *et al.* Adherence Factors in Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Expressing the Localized Adherence-Like Pattern in HEp-2 Cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 302–306, jan. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01980-09>>.

SCALETISKY, ISABEL C A; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive Patterns of Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa Cells. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 2, p. 534–536, 1984.

SHEIKH, J. *et al.* A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 9, p. 1329–1337, 1 nov. 2002. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/16172>>.

SHIN, J. *et al.* An Outbreak of Foodborne Illness Caused by Enteroaggregative *Escherichia coli* in a High School in South Korea. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 68, n. 6, p. 514–519, 2015. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/68/6/68_JJID.2014.460/_article>.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508–513, maio 2002. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/5/01-0385_article.htm>.

VIEIRA, M. A. *et al.* Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiological agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 998–1006, 1 set. 2016. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000313>>.

VIEIRA, M. A. *et al.* Diversity of strategies used by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to induce attaching and effacing lesion in epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 940–951, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000998>>.

VIEIRA, M. A. M. *et al.* Prevalence and Characteristics of the O122 Pathogenicity Island in Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1452–1455, 1 abr. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01944-09>>.

VIEIRA, MÔNICA A. M. *et al.* 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 5, p. 762–772, mar. 2001.

VOSENKÄMPER, A.; MACDONALD, T. T.; MARCHÈS, O. Always one step ahead: How pathogenic bacteria use the type III secretion system to manipulate the intestinal mucosal immune system. **Journal of Inflammation**, v. 8, n. 1, p. 11, 2011. Disponível em: <<http://www.journal-inflammation.com/content/8/1/11>>.

WERBER, D. *et al.* Outbreaks of virulent diarrheagenic *Escherichia coli*- are we in control? **BMC Medicine**, v. 10, n. 1, p. 11, 2 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/11>>.

WONG, A. R. C. *et al.* Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1420–1438, jun. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x>>.

WHO, World Health Organization. Diarrhoeal disease. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>. Acessado em 9 jan. 2021.

ZHOU, Z. *et al.* An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). **Epidemiology and Infection**, v. 128, n. 3, p. 363–371, 18 jun. 2002. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268802006994/type/journal_article>.

Capítulo 1



Identification of a hybrid atypical enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* (aEPEC/EAEC) clone of serotype O3:H2 associated with a diarrheal outbreak in Brazil

Daiany R. P. de Lira¹ · Adriene M. F. Cavalcanti² · Sandra R. S. Pinheiro² · Henrique Orsi¹ · Luís F. dos Santos² · Rodrigo T. Hernandez¹

Received: 18 May 2021 / Accepted: 11 July 2021
 © Sociedade Brasileira de Microbiologia 2021

Abstract

Enteropathogenic (EPEC) and enteroaggregative (EAEC) *Escherichia coli* are two of the major pathotypes of diarrheagenic *E. coli* causing disease worldwide. Here, we report a diarrheal outbreak caused by *E. coli* of serotype O3:H2, harboring virulence markers from EPEC (*eae*) and/or EAEC (*aggR*). This is likely the first *E. coli* diarrheal outbreak caused by a hybrid atypical-EPEC/EAEC clone reported in Brazil.

Keywords Hybrid aEPEC/EAEC · Diarrhea and outbreak

Escherichia coli isolates associated with diarrheal disease are collectively termed diarrheagenic *E. coli* (DEC). On the basis of a set of molecular and phenotypic features, DEC can be divided into six main pathotypes: 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) [1–3].

EPEC produces a histopathological lesion in infected cells, termed attaching, and effacement (AE), which is characterized by intimate adherence of bacteria to the host cell, leading to microvillus effacement and accumulation of mainly F-actin but also other cytoskeleton elements, underneath adherent bacteria [4, 5]. All the proteins necessary for the AE lesion formation are encoded by genes located on a chromosomal pathogenicity island termed LEE (locus of

enterocyte effacement) region [6]. Among these proteins, it is important to highlight the adhesin intimin encoded by the *eae* (*E. coli* attaching and effacing) gene [7].

One of the first virulence properties identified in EPEC isolates was the formation of very compact clusters of bacteria on the surface of infected epithelial cells (HeLa or Hep-2), which is referred as localized adherence (LA) pattern [8]. The adhesin responsible for the establishment of this phenotype is called bundle-forming pilus (BFP) and is encoded by a set of 14 genes (*bfp* operon) located in the EPEC adherence factor (EAF) plasmid [9, 10]. However, a study with adult volunteers showed that EPEC lacking the EAF plasmid can also cause diarrhea [11], thus leading to the subdivision of this pathotype into two subgroups: typical (tEPEC) and atypical (aEPEC), with the EAF (*bfp*⁺) plasmid present only in tEPEC [12–14]. Since aEPEC do not produce BFP, these isolates produce adherence patterns other than LA, such as the localized adherence-like (LAL) pattern, which differs from the LA pattern by the formation of less compact bacterial microcolonies on the surface of infected cells, detected only in assays performed with extended periods of bacteria-cell incubation [15]. Moreover, there are a large number of isolates that do not produce a characteristic adherence pattern or are non-adherent [16, 17].

The hallmark of EAEC is the production of a bacterial arrangement that resembles stacked bricks on epithelial cells, that is, known as aggregative adherence (AA) pattern [18], as well as biofilm formation on abiotic surface and

Responsible Editor: Elizabeth Andrade Marques

✉ Rodrigo T. Hernandez
 rt.hernandes@unesp.br

¹ Departamento de Ciências Químicas e Biológicas (Setor de Microbiologia e Imunologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Botucatu, Brazil

² Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

intestinal mucosa [19, 20]. The formation of the AA pattern depends on the production of one of the five distinct chaperone-usher aggregative adherence fimbriae (AAF/I—AAF/V) described so far [21–25]. The genes encoding the proteins necessary for the AAFs biogenesis are located in a plasmid (pAA), which also carries genes that encode other EAEC-associated virulence factors and the global virulence regulator *AggR*, which activates the expression of several plasmid and chromosomal virulence factor-encoding genes [26, 27].

In 2011, an outbreak of diarrhea in Germany, caused by a hybrid STEC/EAEC of serotype O104:H4, was responsible for the surprising number of diarrhea cases, namely 3816, of which 845 progressed to hemolytic-uremic syndrome, and a total of 54 deaths were registered [28, 29]. This outbreak drew attention to the emergence of hybrid DEC pathotypes and their high pathogenic potential, and since then, many other hybrid DEC pathotypes have been associated with diarrheal disease worldwide, such as: STEC/ETEC [30, 31] and aEPEC/ETEC [32].

A recently published epidemiological surveillance study carried out in Brazil between 2011 and 2016, involving a total of 5047 patients with acute diarrhea, demonstrated that aEPEC and EAEC appear as the most common DEC pathotypes in the Brazilian scenario [33].

Here, we report an investigation of a community-acquired diarrheal outbreak involving eight patients with acute diarrhea, occurring in São Paulo State, Brazil, during the year of 2010. Briefly, colony-forming bacteria, observed on MacConkey agar plates seeded with the stool samples collected from the diarrheal patients, were biochemically identified as *E. coli*. The presence of the molecular markers used for DEC pathotype identification (*eae*, *bfpB*, *stx1*, *stx2*, *aggR*, *elt*, *est*, and *ipaH*) was

detected by PCR, using primers and conditions as previously described [33], and the somatic (O) and flagellar (H) antigens of the DEC isolates were serologically typed by tube agglutination assays employing absorbed somatic (O1–O188) and flagellar (H1–H56) antisera produced at Instituto Adolfo Lutz (IAL). Furthermore, the adherence pattern produced in HeLa cells was determined, using 3 and 6 h of co-incubation of bacteria and epithelial cells, as previously described [15].

The presence of virulence factor-encoding genes revealed that one diarrheal patient was infected with aEPEC (*eae*⁺/*bfpB*[−]), four with EAEC (*aggR*⁺), and three with a hybrid aEPEC/EAEC (*eae*⁺/*bfpB*[−]/*aggR*⁺), with all DEC isolates obtained classified in the serotype O3:H2. Other enteropathogens, such as *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Yersinia enterocolitica*, rotavirus, and norovirus were not detected in the stool samples obtained from the 8 diarrheal patients evaluated in this study. One DEC isolate per patient was then selected and subjected to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, showing the DEC isolates of serotype O3:H2 with more than 74.1% similarity, regardless of the pathotype. Of importance, the three hybrid aEPEC/EAEC isolates showed more than 94.2% similarity (Fig. 1), thus confirming the first diarrheal outbreak caused by a hybrid aEPEC/EAEC of serotype O3:H2 in Brazil.

EAEC of serotype O3:H2 has been identified in Brazil in diarrheal patients, healthy subjects [33–37], and bovine meat [38], thus pointing out the circulation of this pathogen in our setting, as well as in distinct case–control studies performed worldwide [39–42]. The occurrence of hybrid aEPEC/EAEC isolates appears to be rare in Brazil, but combination of virulence factor-encoding genes from these two DEC pathotypes has already been observed in *E. coli* isolates obtained from

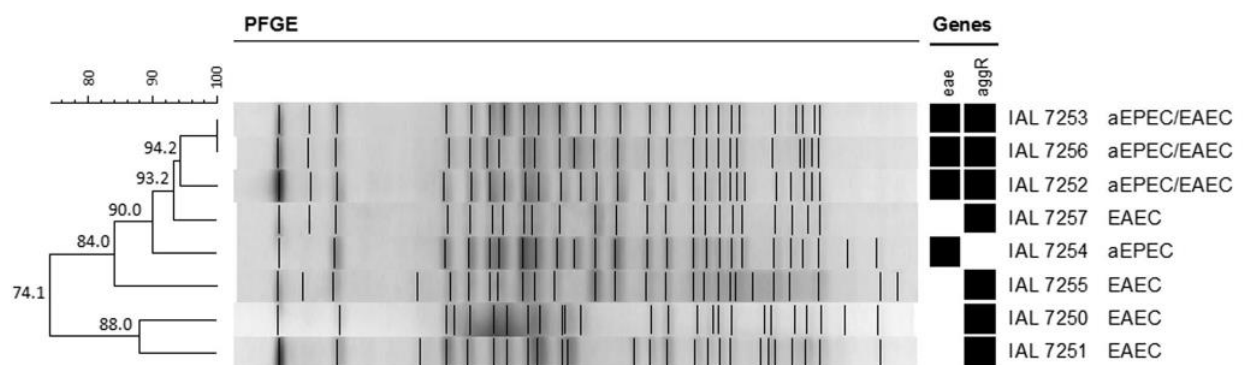
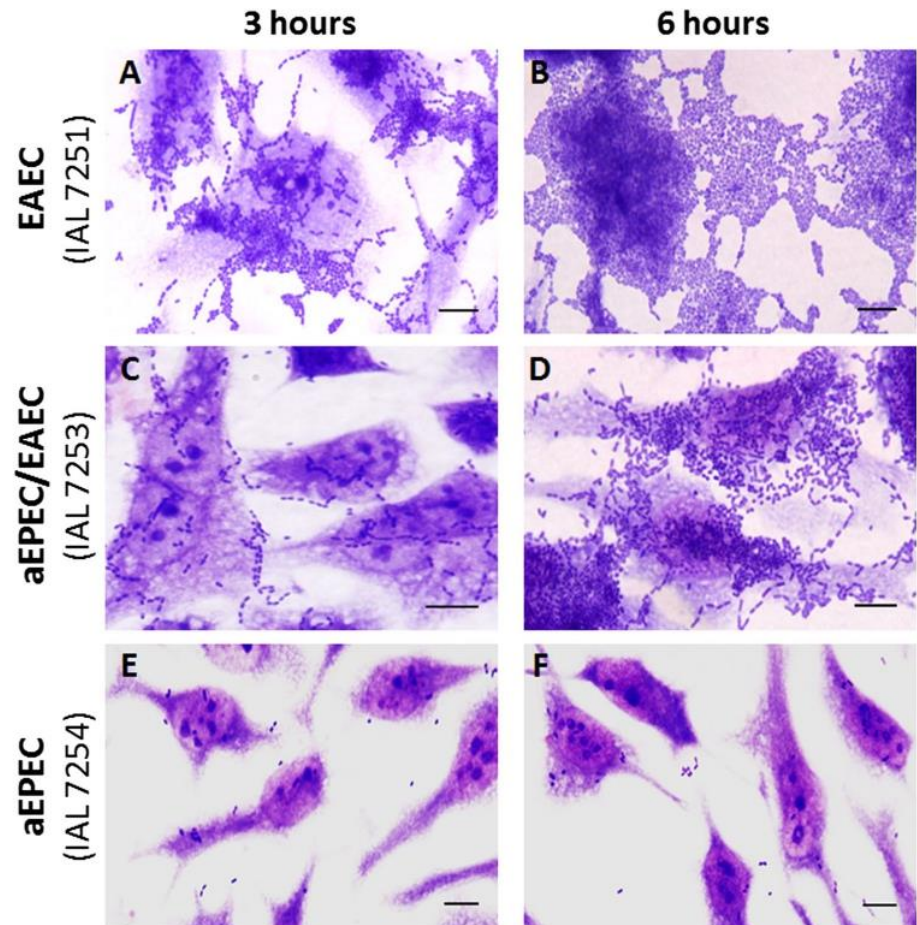


Fig. 1 Dendrogram showing the relationships between EAEC, aEPEC, and hybrid aEPEC/EAEC isolates of serotype O3:H2 obtained during a diarrheal outbreak investigation. The *Xba*I DNA restriction profiles were analyzed in Bionumerics v7.5 (Applied

Maths), and a dendrogram was generated by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) applying the Dice coefficient with optimization and tolerance set at 1.0%

Fig. 2 Adherence pattern displayed in HeLa cells, using 3 (A, C, and E) and 6 (B, D, and F) hours of incubation of cells and bacteria, by representatives EAEC (A and B), aEPEC (E and F), and hybrid aEPEC/EAEC (C and D) isolates of serotype O3:H2. (Bar scale = 10 μ m)



patients with acute diarrhea, from serotypes O142:H34 and O158:HNM [43, 44].

As expected, the four EAEC isolates displayed an AA pattern in HeLa cells in assays performed with 3 and 6 h of incubation. On the other hand, the three hybrid aEPEC/EAEC demonstrated only a trend to form the AA pattern in 3 h, with this phenotype being better observed in the 6-h assay, concomitantly with short chain-like adherence (CLA). In contrast, the aEPEC isolate did not produce a characteristic adherence pattern, adhering only sporadically to HeLa cells, even in assays performed with long incubation periods (Fig. 2).

Here, we report, to the best of our knowledge, the first diarrheal outbreak due to a hybrid aEPEC/EAEC of serotype O3:H2 in Brazil. Future whole genome sequencing studies will be necessary to better understand the genetic background of these hybrid isolates, the horizontal gene transfer events involved in their emergence, and how this particular combination of virulence factors can influence their pathogenic potential.

Funding This study was supported in part by the São Paulo Research Foundation (FAPESP grant 2017/14821-7).

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

1. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11(1):142–201
2. Kaper J, Nataro J, Mobley H (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2:123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicr0818>
3. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 26(4):822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
4. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infect Immun 41(3):1340–1351

5. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS (1989) Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57(4):1290–1298
6. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5):1664–1668. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1664>
7. Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(20):7839–7843. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.7839>
8. Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 45(2):534–536
9. Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254(5032):710–713. <https://doi.org/10.1126/science.1683004>
10. Donnenberg MS, Giron JA, Nataro JP, Kaper JB (1992) A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 6:3427–3437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02210.x>
11. Levine MM, Nataro JP, Karch H et al (1985) The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* 152(3):550–559. <https://doi.org/10.1093/infdis/152.3.550>
12. Kaper JB (1996) Defining EPEC. *Rev Microbiol* 27:130–133
13. Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT (2002) Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 8(5):508–513. <https://doi.org/10.3201/eid0805.010385>
14. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MA, Gomes TA (2009) An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 297(2):137–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x>
15. Rodrigues J, Scaletsky IC, Campos LC, Gomes TAT, Whittam TS, Trabulsi LR (1996) Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun* 64(7):2680–2686
16. Abe CM, Trabulsi LR, Blanco J et al (2009) Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*⁺ EAF-negative *stx*[−] genetic profile. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64(4):357–365. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.025>
17. Vieira MA, Dias RC, dos Santos LF, Rall VL, Gomes TA, Hernandez RT (2019) Diversity of strategies used by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to induce attaching and effacing lesion in epithelial cells. *J Med Microbiol* 68(6):940–951. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000998>
18. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6(9):829–831. <https://doi.org/10.1097/00006454-198709000-00008>
19. Hicks S, Candy DC, Phillips AD (1996) Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. *Infect Immun* 64(11):4751–4760
20. Sheikh J, Hicks S, Dall'Agnol M, Phillips AD, Nataro JP (2001) Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41:983–997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02512.x>
21. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM (1992) Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 60(6):2297–2304
22. Czekzulín JR, Balepur S, Hicks S et al (1997) Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 65(10):4135–4145. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.10.4135-4145.1997>
23. Bernier C, Gounon P, Le Bouguénec C (2002) Identification of an aggregative adherence fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun* 70(8):4302–4311. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4302-4311.2002>
24. Boisen N, Struve C, Scheut F, Krogfelt KA, Nataro JP (2008) New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun* 76(7):3281–3292. <https://doi.org/10.1128/IAI.01646-07>
25. Jönsson R, Struve C, Boisen N et al (2015) Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 83(4):1396–1405. <https://doi.org/10.1128/IAI.02820-14>
26. Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP (2006) Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 61:1267–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05281.x>
27. Morin N, Santiago AE, Ernst RK, Guillot SJ, Nataro JP (2013) Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 81(1):122–132. <https://doi.org/10.1128/IAI.00676-12>
28. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W et al (2011) Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 11(9):671–676. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70165-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70165-7)
29. Kaper James B, O'Brien Alison D (2015) Overview and historical perspectives. In: Sperandio V, Hovde CJ (eds) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other Shiga toxin-producing *E. coli*. ASM Press, Washington, DC, pp 1–13. <https://doi.org/10.1128/9781555818791.ch1>
30. Bai X, Zhang J, Ambikan A et al (2019) Molecular characterization and comparative genomics of clinical hybrid Shiga toxin-producing and enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) strains in Sweden. *Sci Rep* 9(1):1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42122-z>
31. Cavalcanti A, Hernandez RT, Takagi EH et al (2020) virulence profiling and molecular typing of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) from human sources in Brazil. *Microorganisms* 8(2):171. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020171>
32. Hazen TH, Michalski J, Luo Q et al (2017) Comparative genomics and transcriptomics of *Escherichia coli* isolates carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli*. *Sci Rep* 7(1):1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03489-z>
33. Ori E, Takagi E, Andrade T et al (2019) Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. *Epidemiol Infect* 147:E10. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002595>
34. Zamboni A, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC (2004) Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. *J Clin Microbiol* 42(3):1058–1063. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1058-1063.2004>
35. Moreno ACR, Fernandes Filho A, Gomes TAT (2010) Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66(1):50–57. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.017>

36. França FLS, Wells TJ, Browning DF et al (2013) Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro Brazil. PLoS ONE 8(7):e69971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069971>
37. Dias RC, Tanabe RH, Vieira MA et al (2020) Analysis of the virulence profile and phenotypic features of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated from diarrheal patients in Brazil. Front Cell Infect Microbiol 10:144. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00144>
38. Pelayo JS, Elias Junior AR, de Lima NR, Navarro A, da Rocha SPD (2019) Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in bovine meat in the Northern Region of Paraná State Brazil. Braz Arch Biol Technol 62:e19180012. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180012>
39. Vial PA, Robins-Browne R, Lior H et al (1988) Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis 158(1):70–79. <https://doi.org/10.1093/infdis/158.1.70>
40. Foster MA, Iqbal J, Zhang C, McHenry R et al (2015) Enteropathogenic and enteroaggregative *E. coli* in stools of children with acute gastroenteritis in Davidson County Tennessee. Diagn Microbiol Infect Dis 83(3):319–324. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.016>
41. Hebbelstrup Jensen B, Stensvold CR, Struve C et al (2016) Enteroaggregative *Escherichia coli* in daycare—a 1-year dynamic cohort study. Front Cell Infect Microbiol 6:75. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00075>
42. Petro CD, Duncan JK, Seldina YI et al (2020) Genetic and Virulence Profiles of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated from deployed military personnel (DMP) with travelers' diarrhea. Front Cell Infect Microbiol 10:200. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00200>
43. Ghilardi ACR, Gomes TAT, Elias WP, Trabulsi LR (2003) Virulence factors of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O127 and O142. Epidemiol Infect 131(2):815–821. <https://doi.org/10.1017/S095026880300877X>
44. Liebchen A, Benz I, Mellmann A et al (2011) Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from patients with diarrhea in Sao Paulo, Brazil: identification of intermediate virulence factor profiles by multiplex PCR. J Clin Microbiol 49(6):2274–2278. <https://doi.org/10.1128/JCM.00386-11>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Capítulo 2

**Caracterização molecular e fenotípica de isolados de *Escherichia coli*
enteropatogênica atípica (aEPEC), enteroagregativa (EAEC) e híbridos
aEPEC/EAEC do sorotipo O3:H2**

Daiany R. P. de Lira¹, Henrique Orsi¹, Ana C. M. dos Santos², Tânia A. T. Gomes², Waldir P. Elias³, Eneas de Carvalho³, Luís F. dos Santos⁴, Rodrigo T. Hernandez^{1*}

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, SP, Brasil.

²Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP - EPM), São Paulo, SP, Brasil

³Instituto Butantã, Laboratório de Bacteriologia, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil

*Autor correspondente: Rodrigo Tavanelli Hernandez. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Ciências Químicas e Biológicas (Setor de Microbiologia e Imunologia), Instituto de Biociências, Campus de Botucatu. Rua Dr. Plínio Pinto e Silva. S/N. Distrito de Rubião Júnior - Botucatu/SP, Brasil. CEP: 18.618-691. Telefone: 55 14 3880-0446. e-mail: rt.hernandes@unesp.br

Resumo

E. coli enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) são importantes agentes etiológicos de diarreia ao redor do mundo. EAEC adere às células epiteliais (HEp-2 e HeLa) no padrão de adesão agregativo, onde as bactérias empilham-se umas sobre as outras formando um arranjo que lembram tijolos empilhados. As adesinas envolvidas nesse padrão são denominadas fímbrias de aderência agregativas (AAF/I-AAF/V), e, além de promover o padrão AA, também são responsáveis pela formação de biofilme. EPEC é responsável por causar uma lesão histopatológica nos enterócitos, chamada de lesão *attaching and effacement* (AE). O arsenal proteico envolvido nessa patogenese é codificado por genes localizados na ilha de patogenicidade cromossomal *locus of enterocyte effacement* (região LEE). Mediante a presença ou ausência do plasmídeo EAF, onde estão inseridos os genes que codificam a fímbria BFP (*bundle-forming pilus*), as EPEC são classificadas como típicas (tEPEC) ou atípicas (aEPEC), respectivamente. Recentemente o nosso laboratório relatou um surto de diarreia devido a um isolado híbrido de aEPEC/EAEC do sorotipo O3:H2, no Brasil, onde, durante a investigação do surto também foram obtidos isolados de aEPEC e EAEC do mesmo sorotipo. O objetivo do presente estudo foi compreender melhor a evolução de híbridos através de técnicas moleculares e avaliar a influência de diferentes combinações gênicas na patogenicidade dessas bactérias. Os oito isolados aqui estudados (um aEPEC, quatro EAEC e três híbridos de aEPEC/EAEC) do sorotipo O3:H2 pertencem ao filogruppo A. Os híbridos de aEPEC/EAEC compartilham genes cromossomais com o isolado de aEPEC (*eae*, *nleC* e *nleF*) e plasmidiais com EAEC (*aggA*, *aggC*, *aap*, *orf3* e *aar*). Ao avaliar o perfil plasmidial notou-se que todos os híbridos de aEPEC/EAEC e EAEC compartilhavam um plasmídeo de alto peso molecular e que estes foram produtores de biofilme na presença de D-manose. Os isolados híbridos de aEPEC/EAEC foram capazes de polimerizar F-actina, indicando indiretamente sua capacidade de induzir a lesão nas células infectadas, diferentemente da aEPEC. Os resultados sugerem que um isolado de aEPEC tenha servido como receptor do pAA, originando assim, híbridos de aEPEC/EAEC do sorotipo O3:H2, conferindo a esses híbridos um maior arsenal de virulência para colonizar e causar danos ao seu hospedeiro.

Palavras-chave: diarreia, virulência, híbridos e patogenicidade.

Abstract

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) are important etiologic agents of diarrhea around the world. EAEC adheres to epithelial cells (Hep-2 and HeLa) in the aggregative adhesion pattern, where bacteria stack on top of each other in an arrangement resembling stacked bricks. The adhesins involved in this pattern are called aggregative adhesion fimbriae (AAF/I-AAF/V), and, in addition to promoting the AA pattern, they are also responsible for biofilm formation. EPEC is responsible for causing a histopathological lesion in enterocytes, called attaching and effacement (AE) lesion. The protein arsenal involved in this pathogenesis is encoded by genes located in the chromosomal pathogenicity island locus of enterocyte effacement (LEE region). By the presence or absence of the EAF plasmid, where the genes that encode the BFP fimbriae (bundle-forming pilus) are inserted, EPEC are classified as typical (tEPEC) or atypical (aEPEC), respectively. Recently, our laboratory reported an outbreak of diarrhea due to a hybrid isolate of aEPEC/EAEC of serotype O3:H2, in Brazil, where, during the investigation of the outbreak, isolates of aEPEC and EAEC of the same serotype were also obtained. The objective of the present study was to better understand the evolution of hybrids through molecular techniques and to evaluate the influence of different gene combinations on the pathogenicity of these bacteria. The eight isolates studied here (one aEPEC, four EAEC and three aEPEC/EAEC hybrids) of serotype O3:H2 belong to phylogroup A. The aEPEC/EAEC hybrids share chromosomal genes with the aEPEC isolate (*ea*, *nleC* and *nleF*) and EAEC plasmids (*aggA*, *aggC*, *aap*, *orf3* and *aar*). When evaluating the plasmid profile, it was noted that all aEPEC/EAEC and EAEC hybrids share a high molecular weight plasmid, and that they are biofilm producers in the presence of D-mannose. The aEPEC/EAEC hybrid isolates were able to polymerize F-actin, indirectly indicating their ability to induce injury in infected cells, unlike aEPEC. Our data suggest that an aEPEC isolate served as a pAA receptor, thus giving rise to aEPEC/EAEC hybrids of serotype O3:H2, giving these hybrids a greater arsenal of virulence to colonize and cause damage to their host.

Keywords: diarrhea, virulence, hybrids and pathogenicity

1. Introdução

O patótipo *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é definido pela capacidade de aderir às células epiteliais (Hep-2 ou HeLa) de forma semelhante a tijolos empilhados, denominado padrão de aderência agregativa (AA) (NATARO *et al.*, 1987). Além de aderir aos enterócitos, EAEC é capaz de produzir biofilme, toxinas e inflamar a mucosa intestinal, levando, assim, a um quadro clínico de diarreia (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; NATARO; KAPER, 1998). Além de casos esporádicos de diarreia (ARAUJO *et al.*, 2007; BUERIS *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2006; IIJIMA *et al.*, 2017; ORI *et al.*, 2019), surtos por EAEC já foram registrados na Coréia do Sul, Inglaterra e Japão (DALLMAN *et al.*, 2014; ITOH *et al.*, 1997; SHIN *et al.*, 2015). EAEC também tem sido associada a quadros de diarreia persistente (duração igual ou superior a 14 dias) (BHATNAGAR *et al.*, 1993; OKEKE *et al.*, 2000), bem como, infecções assintomáticas por esse patógeno têm sido relacionadas a casos de desnutrição, especialmente entre crianças que vivem em países em desenvolvimento (HAVT *et al.*, 2017).

Um importante fator de virulência de EAEC é a presença de um plasmídeo de alto peso molecular denominado pAA (CZECZULIN *et al.*, 1999), onde encontram-se genes que codificam as fímbrias de aderência agregativa (*aggregative adherence fimbriae* - AAF), que são responsáveis pelo estabelecimento do padrão AA, sendo que, até o momento, cinco variantes de AAFs foram descritas (AAF/I-AAF/V) (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUENEC, 2002; BOISEN *et al.*, 2008; CZECZULIN *et al.*, 1999; JØNSSON *et al.*, 2015; NATARO *et al.*, 1992).

Além do *operon* responsável por codificar as AAFs, o plasmídeo pAA alberga o gene responsável por codificar um regulador transcricional (AggR) (NATARO *et al.*, 1994), capaz de ativar a expressão de genes plasmidiais, os genes relacionados na codificação das AAFs (NATARO *et al.*, 1994), dispersina (*aap*) e no transportador do complexo Aat (*aat*) (HARRINGTON, DUDLEY, NATARO, 2006), bem como, de ativar a transcrição de genes cromossômicos, como por exemplo, dos genes localizados no operon *aaiA-Y*, responsável por codificar um Sistema de Secreção do Tipo 6 (DUDLEY *et al.*, 2006; HÜTTENER *et al.*, 2018; MORIN *et al.*, 2010; PRIETO *et al.*, 2021). Diante da importância desse regulador genético, EAEC foi dividida em dois grupos: EAEC típica e EAEC atípica, com base na presença do gene *aggR* em EAEC típica, e ausência desse gene na EAEC atípica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

E. coli enteropatogênica (EPEC) é caracterizada pela sua capacidade de causar uma lesão histopatológica nos enterócitos, denominada *attaching and effacement* (AE), onde as

bactérias aderem intimamente à célula hospedeira, lesam as microvilosidades e recrutam F-actina e outros elementos do citoesqueleto, culminando na formação de uma estrutura semelhante a um pedestal (KNUTTON *et al.*, 1989; MOON *et al.*, 1983). Todo o aparato proteico envolvido nessa lesão são codificados por genes localizados numa ilha de patogenicidade cromossomal chamada *locus of enterocyte effacement* ou região LEE (MCDANIEL *et al.*, 1995). Dentre os fatores de virulência codificados pelos genes da região LEE, vale destacar a adesina intimina (codificada pelo gene *eae*), associada a adesão íntima da bactéria com às células hospedeiras (JERSE *et al.*, 1990).

As EPEC são divididas em dois grupos mediante a presença do plasmídio EAF (EPEC *adherence factor*) nas EPEC típicas (tEPEC) e ausência nas EPEC atípicas (aEPEC) (HERNANDES *et al.*, 2009; KAPER, 1996; TRABULSI, KELLER, GOMES, 2002). O pEAF alberga um conjunto de 14 genes responsáveis por codificar proteínas envolvidas na biogênese do *bundle-forming pilus* (BFP), que medeia a formação de microcolônias compactas na superfície das células epiteliais (HeLa ou Hep-2), sendo esse fenótipo denominado padrão de aderência localizada (AL) (SCALETSKY *et al.*, 1984; DONNENBERG *et al.*, 1992). Devido a ausência de BFP, as aEPEC aderem às células eucarióticas formando microcolônias frouxas, que caracterizam o padrão de aderência localizado-like (ROGRIGUES *et al.*, 1996). No entanto, há aEPEC que aderem apenas esporadicamente as células epiteliais, ou simplesmente, não são aderentes (ABE *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2019).

Em 2011, ocorreu um importante surto de diarreia na Alemanha no qual foram registrados 3.816 casos de diarreia, 845 casos de síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e 54 óbitos (KAPER; O'BRIEN, 2014; KARCH *et al.*, 2012; WERBER *et al.*, 2012). O patógeno envolvido nesse surto foi uma *E. coli* do sorotipo O104:H4 que albergava fatores de virulência de dois patótipos de ECD distintos, *i.e.* EAEC (pAA carreando o *operon aggABCD* que codifica a AAF/I) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (que codifica a toxina Shiga, *stx2*) (STEC), sendo esse isolado classificado como um híbrido de STEC/EAEC (BIELASZEWSKA *et al.*, 2011, MELLMANN *et al.*, 2011; RASKO, *et al.*, 2011). Até o presente, pode-se enfatizar na literatura relatos de isolados híbridos entéricos de STEC/EAEC, de outros sorotipos além do O104:H4, tais como O59:H[19] e OR:H[8] (PRAGER *et al.*, 2014), EPEC/ETEC (HAZEN *et al.*, 2017) e STEC/ETEC (BAI *et al.*, 2019; CAVALCANTI *et al.*, 2020; NYHOLM *et al.*, 2015).

Recentemente, nosso laboratório descreveu um surto de diarreia por um isolado de *E. coli* albergando concomitantemente fatores de virulência de aEPEC (*eae*) e EAEC (*aggR*), híbrido de aEPEC/EAEC, do sorotipo O3:H2 (DE LIRA *et al.*, 2021). Durante a investigação desse surto também foram obtidos isolados de aEPEC e EAEC do mesmo sorotipo. Sendo

assim, nosso objetivo foi avaliar características moleculares, para melhor compreender a evolução desses híbridos, e fenotípicas com o objetivo de avaliar a influência de diferentes combinações gênicas na patogenicidade dessas bactérias.

2. Material e métodos

2.1. Isolados de aEPEC, EAEC e híbridos de aEPEC/EAEC do sorotipo O3:H2 estudados

Foram incluídos nesse estudo isolados de aEPEC, EAEC e híbridos de aEPEC/EAEC, do sorotipo O3:H2 (Tabela 1), obtidos durante a investigação de um surto de diarreia ocorrido na cidade de Sorocaba, interior do estado de São Paulo, Brasil (DE LIRA *et al.*, 2021).

Tabela 1. Isolados de DEC do sorotipo O3:H2 a serem utilizados no presente estudo.

Identificação dos isolados	Origem	Ano de isolamento	Marcadores genéticos	Patotipo
IAL 7250	Sorocaba/SP	2010	<i>aggR</i> ⁺	EAEC
IAL 7251	Sorocaba/SP	2010	<i>aggR</i> ⁺	EAEC
IAL 7252	Sorocaba/SP	2010	<i>eae</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁺	aEPEC/EAEC
IAL 7253	Sorocaba/SP	2010	<i>eae</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁺	aEPEC/EAEC
IAL 7256	Sorocaba/SP	2010	<i>eae</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁺	aEPEC/EAEC
IAL 7255	Sorocaba/SP	2010	<i>aggR</i> ⁺	EAEC
IAL 7254	Sorocaba/SP	2010	<i>eae</i> ⁺	aEPEC
IAL 7257	Sorocaba/SP	2010	<i>aggR</i> ⁺	EAEC

2.2 Identificação de marcadores de virulência associados aos patotipos de EPEC e EAEC nos isolados de *E. coli* do sorotipo O3:H2 estudados

A identificação dos genes de virulência foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA-molde para as reações de amplificação foi obtido por meio de lisados bacterianos, no qual uma colônia isolada de uma placa de ágar MacConkey foi transferida para um microtubo de centrifugação de 1,5 mL contendo 200 µL de água ultra pura estéril e submetida à fervura por 10 minutos, sendo após a fervura imediatamente centrifugadas durante um minuto à 9391 x g e, posteriormente, armazenada em freezer. Para cada reação foi utilizado 1 µL do DNA molde, 7,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, 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 nas Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a pesquisa de genes associados a patogênese de EPEC e STEC entre os isolados *E. coli* do sorotipo O3:H2 analisados nesse estudo.

Genes	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Localização	Referência
Adesinas					
<i>paa</i>	GGATCCATGAGGAACATAA CTCGAGAGTGCCTTTCCTGG	52	605	Cromossomo	Batissou <i>et al.</i> , (2003)
<i>iha</i>	CAGGTCGGGGTTACCAAGT CAAATGGCTCTCTTCCGTCAATGC	48	925	Cromossomo (OI-48 ^a)	Szalo <i>et al.</i> , (2002)
<i>saa</i>	CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC	60	119	Plasmídeo (pO113)	Paton e Paton, (2002)
<i>efa1/lifA</i>	AAGGTGTTACAGAGATTA TGAGGCGGCAGGATAGTT	50	268	Cromossomo (OI-122 ^a /IE6 ^b)	Nicholls, Grant e Robins-Browne (2000)
Toxinas					
<i>cdt</i>	GAAARTAAATGGAAYAYAMATGTCCG AATCWCCWRSAAATCATCCAGTTA	43	466	Cromossomo	Tennant <i>et al.</i> , (2009)

Tabela 2. Continuação.

Genes	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Localização	Referência
<i>espP</i>	GTCCATGCAGGGACATGCCA TCACATCAGCACCGTTCTCTAT	50	547	Plasmídeo (pO157)	Boisen <i>et al.</i> , (2009)
<i>ehxA</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	50	534	Plasmídeo (pO157)	Paton & Paton, (1998)
<i>subAB</i>	GTACGGACTAACAGGGAACTG GCAAAAGCCTTCGTGTAGTC	49	1844	Plasmídeo (pO113)	Paton <i>et al.</i> , (2004)
<i>cnf</i>	TTATATAGTCGTCAAGATGGA CACTAAGCTTTACAATATTGA	45	633	Cromossomo	Toth <i>et al.</i> , (2003)
Proteínas efetoras					
<i>nleF</i>	TTTGTAAGTGGGCTGATGGA CTGAAGAGTGATGCGGACAT	48	192	Cromossomo (PP6 ^b)	Afset <i>et al.</i> , (2006)
<i>nleB</i>	GGTGTGCTGGTAGATGGA CAGGGTATGATTCTTGTTTATG	50	175	Cromossomo (OI-122 ^a /IE6 ^b)	Afset <i>et al.</i> , (2006)

Tabela 2. Continuação.

Genes	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Localização	Referência
<i>nleE</i>	CTAATACTCAGGGCGTGTCC ACCGTCTGGCTTTCTCGTTA	50	192	Cromossomo (OI-122 ^a /IE6 ^b)	Afset <i>et al.</i> , (2006)
<i>nleC</i>	TATGCGGATTACGTTTTGGA TACGGCATCACGAAATGTCT	48	192	Cromossomo (PP4 ^b)	Afset <i>et al.</i> , (2006)
<i>ibe</i>	TTCTTAAGTGCGGAGATGA TTAGTCAATATCTGTGGGTT	45	425	Cromossomo (5' da região LEE)	Buss <i>et al.</i> , (2009)
<i>cif</i>	AACAGATGGCAACAGACTGG AGTCAATGCTTTATGCGTCAT	50	383	Cromossomo (GEI 0.81 ^c)	Afset <i>et al.</i> , (2006)
<i>nleD</i>	TGCTCCATGTTTTCCACAAT CTGTTGGAATCCCAGACTCA	48	245	Cromossomo (PP4 ^b)	Afset <i>et al.</i> , (2006)
<i>nleA/espI</i>	ATGAACATTCAACCGACCATAACAATCTG TTAGACTCTTGTTTCTTGGATTATATCA	40	1326	Cromossomo (PP6 ^b)	Afset <i>et al.</i> , (2006)
<i>espT</i>	AATCTCATTCTCTTATC TCATGTGATGAGTGGATG	42	263	Plasmíde (pE110019_65)	Arbeloa <i>et al.</i> , (2009)

^{a,b,c}Localização no cromossomo das amostras protótipos de EPEC e EHEC: EDL933 (^a), E2348/69 (^b) e B171 (^c). IE: elemento integrativo, PP: profago, GEI: ilha genômica. pb: pares de base.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para a pesquisa de genes associados a patogênese de EAEC entre os isolados *E. coli* do sorotipo O3:H2 analisados nesse estudo.

Genes	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Localização	Referência
Adesinas					
<i>aagA</i>	TCTATCTRGGGGGGCTAACG ACCTGTTCCCCATAACCAGAC	52	218	Plasmídeo (pAA)	Jønsson <i>et al.</i> , (2017)
<i>aafA</i>	ACATGCATGCAAAAAATCAGAATGTTTGTT CGGGATCCATTTGTCACAAGCTCAGC	65	550	Plasmídeo (pAA)	Czeczulin <i>et al.</i> , (1997)
<i>agg3A</i>	GTATCATTGCGAGTCTGGTATTCAG GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG	55	462	Plasmídeo (pAA)	Bernier, Gounon e Le Bouguenec (2002)
<i>agg4A</i>	TCCATTATGTCAGGCTGCAA GGCGTTAACGTCTGATTTCC	55	411	Plasmídeo (pAA)	Boisen <i>et al.</i> , (2008)
<i>agg5A</i>	CATGTTTCATTATCTATTAGTTCGCC TCCACCGTACGTCGTCATTA	57	215	Plasmídeo (pAA)	Jønsson <i>et al.</i> , (2015)
<i>aggC</i>	GTGATCCCCCAAGCTACAGA ATCCCAATGCATTACCCTGA	55	850	Plasmídeo (pAA)	Boisen <i>et al.</i> , (2008)

Tabela 3. Continuação.

Genes	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Localização	Referência
<i>aafC</i>	AACGGATACGCCAAGTGTTTC GCACCTGTGGTGAGAGGAAT	55	496	Plasmídeo (pAA)	Boisen <i>et al.</i> , (2008)
<i>agg3/4/5C</i>	CATARTGAAGGTATAACATTTGGTCAGA GTCAGCATAACACTTACTGTTCATTC GTAGTTTGCATAGCAATGGCTATTCATT	55	477	Plasmídeo (pAA)	Jønsson <i>et al.</i> , (2017)
<i>afpA2</i>	ATCGTCTCCGCTGTTAACGG TTTACAAGCATTGGCAGCACCAGC	55	381	Plasmídeo (pAFP)	Lang <i>et al.</i> , (2018)
<i>afpB</i>	TACAACGATGTCAGGGGTGC TTACCCTGTCGCTTTCCACC	55	420	Plasmídeo (pAFP)	Lang <i>et al.</i> , (2018)
<i>afpR</i>	GTGAAGAACATTATTGAAGGGGGC CATCACTTAATCGCCAGCGTT	55	307	Plasmídeo (pAFP)	Lang <i>et al.</i> , (2018)
Toxinas					
<i>pic</i>	GGGTATTGTCCGTTCCGAT ACAACGATACCGTCTCCCG	50	1175	Cromossomo	Czeczulin <i>et al.</i> , (1999)
<i>pet</i>	GTGTTTCAACCAGGTTCAACA CCTTCACCAATTTTATGCAGT	50	1037	Plasmídeo (pAA)	Gioppo <i>et al.</i> , (2000)

Tabela 3. Continuação.

Genes	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Localização	Referência
<i>sigA</i>	CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTGTTG	55	430	Cromossomo	Boisen <i>et al.</i> , (2009)
<i>sepA</i>	GCAGTGGAAATATGATGCGGC TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	55	794	Plasmídeo	Restieri <i>et al.</i> , (2007)
<i>astA</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	55	111	Plasmídeo (pAA)	Savarino <i>et al.</i> , (1993)
Outros					
<i>aap</i>	CTTTTCTGGCATCTTGGGT GTAACAACCCCTTTGGAAGT	52	232	Plasmídeo (pAA)	Czeczulin <i>et al.</i> , (1999)
<i>aaiA</i>	CCCACGACCAGATAACG GTTTTCAGGATTGCCATTAG	50	476	Cromossomo (<i>aai</i> operon)	Andrade, Gomes e Elias (2014)
<i>aaiC</i>	ATTGTCCTCAGGCATTTACACG ACACCCCTGATAAACA	50	215	Cromossomo (<i>aai</i> operon)	Lima <i>et al.</i> , (2013)
<i>aaiG</i>	GGGAGTGTTTCAGTCTGGAC ATTTGTCACAAGCTCAGCAT	50	782	Cromossomo (<i>aai</i> operon)	Andrade, Gomes e Elias (2014)

pb: pares de base.

Após a amplificação da região de interesse do DNA, 5 µl de cada reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose 1% foi preparado fundindo a agarose (Agargen, Espanha) em tampão TBE 1X (Tris – ácido bórico 90 Mm, EDTA 2 Mm, pH 8,0). A eletroforese foi realizada utilizando como tampão de corrida o TBE 0,5X, em uma tensão constante de 100V durante 30 minutos. O marcador de peso molecular 100bp DNA *Ladder* (Promega, USA) foi utilizado para verificar o tamanho dos produtos amplificados. A coloração do gel com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA), numa concentração de 1:10.000, foi utilizada para a detecção das bandas, bem como visualizadas através de um transiluminador de luz ultravioleta, e as imagens foram registradas por um sistema de captação de imagens AlphaImager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

2.3 Identificação do grupo filogenético

A identificação dos grupos filogenéticos foi realizada de acordo com o método descrito por Clermont *et al.*, 2013, através de PCR multiplex. Os genes investigados estão listados na Tabela 4. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel à 1,5% de agarose, em TBE 1X (tampão de ácido bórico-Tris-EDTA), e marcados com Sybr Green® (Invitrogen, Califórnia, USA). Na análise dos fragmentos de DNA foi utilizado o *ladder* de 100 pb. Para o controle negativo da reação, foi usada água *nuclease-free* e um controle positivo para cada gene. Caso os isolados ficassem entre os filogrupos B2 e F, foi realizado o PCR para o grupo G (CLERMONT *et al.*, 2019).

Tabela 4. Descrição dos primers utilizados para identificação do grupo filogenético.

Genes	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Quadriplex			
<i>chuA.1b</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	59	288
<i>chuA.2</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>yjaA.1b</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	59	211
<i>yjaA.2b</i>	AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	59	152
TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
<i>AceK.f</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	59	400

<i>ArpA1.r</i>	TCTCCCCATACCGTACGCTA		
Grupo E			
<i>ArpAgpE.f</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	57	301
<i>ArpAgpE.r</i>	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG		
Grupo C			
<i>trpAgpC.1</i>	AGTTTTATGCCCAGTGCGAG	59	219
<i>trpAgpC.2</i>	TCTGCGCCGGTCACGCCC		
Controle interno			
<i>trpBA.f</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	57 ^a /59 ^b	489
<i>trpBA.r</i>	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		

^aT. anelamento utilizada para a realização da reação de PCR Multiplex quando utilizado o iniciador para o gene *ArpAgpE*. ^bT. anelamento utilizada para a realização da reação de PCR Multiplex quando utilizado o iniciador para o gene *trpAgpC*. pb: pares de base.

2.4 Avaliação do perfil plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando a técnica de lise alcalina descrita por Birnboim e Doly (1979), com algumas modificações conforme descrito a seguir. Inicialmente 1 mL da suspensão bacteriana crescida em caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*, Difco), por 18-24 horas, foi aliqotada em um microtubo de polipropileno e centrifugado a 9391 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 100 µL da solução I (lisozima 4 mg/mL, glicose 2%, TE 25/10 mM, RNase 10 mg/mL e H₂O q.s.p.), seguido de incubação em gelo por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado 200 µL da solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1% e H₂O q.s.p.) à preparação, que foi homogeneizada por inversão do tubo até que se tornasse translúcida, depois, incubada em banho de gelo por 7 minutos. Em seguida foram acrescidos 150 µL da solução III (acetato de sódio 3 M pH 4,8), homogeneizou-se por inversão do microtubo, incubado em gelo, durante 1 hora. A preparação foi centrifugada a 13523 x g por 10 minutos e o sobrenadante, contendo o DNA plasmidial, foi transferido para outro microtubo estéril. O DNA plasmidial foi precipitado após a adição de 1 mL (aproximadamente 2 volumes) de etanol absoluto gelado e levados ao freezer a -20 °C por, no mínimo, 2 horas. Após esse período, a preparação foi centrifugada durante 10 minutos a 13523 x g, retirou-se o sobrenadante a vácuo, e, em seguida, o pellet foi ressuspenso em 100 µL da solução IV (acetato 100 mM/mL. TRIS 25 mM/mL e H₂O q.s.p.) e 200 µL de etanol absoluto (2 volumes), a preparação foi incubada no freezer -20 °C por no mínimo 1 hora 30 minutos. Posteriormente, para sedimentar o DNA plasmidial centrifugou-se o microtubo durante 10

minutos à 13523 x g, o sobrenadante foi desprezado e o tubo foi mantido aberto no fluxo laminar até o etanol evaporar totalmente. Em seguida, o DNA plasmidial foi ressuspensão em 15 µL de TE pH 7,4, acrescido de 5 µL de solução tampão corante para eletroforese e submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 0,5 X. Como controle do experimento, no gel, foi acrescentado o conteúdo plasmidial da amostra 36R861 *National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory - NCTCC-PHL- Colindale, Londres, UK* que contém quatro plasmídios de tamanho molecular conhecido (147 kb, 63 kb, 58, 35,8 kb e 6,9 kb). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado utilizando o transiluminador de luz UV.

2.5 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica

O teste de formação de biofilme foi realizado de acordo com Oliveira-Garcia e colaboradores (2003), com algumas modificações. Em cada poço da microplaca de 96 poços, foram adicionados 200 µL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, *high glucose*) (Sigma-Aldrich # D6429) e 10 µL de suspensão bacteriana crescida no caldo Luria Bertani (LB) overnight à 37°C. Após 24 horas incubação à 37 °C, cada poço foi lavado uma vez com a solução salina tamponada com fosfato (PBS) e adicionado 200 µL de formaldeído à 3%. Após uma hora de repouso, o formaldeído foi retirado e adicionou-se 200 µL de cristal violeta à 1% em cada poço. Depois de 20 minutos, foi lavado duas vezes com água destilada e seco em temperatura ambiente, para então se adicionar 200 µL de metanol por 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor ELISA, numa densidade óptica (DO) de 570 nm. O teste de formação de biofilme foi realizado novamente seguindo o mesmo princípio, entretanto, com a adição de 2% D-manose ao meio do teste (DMEM *high glucose*). A análise estatística foi empregada utilizando o software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), a normalidade foi testada pelo método de Shapiro-Wilk para verificar se o resultado do biofilme foi paramétrico ou não paramétrico. Quando classificado nesse primeiro realizou-se o teste T, por outro lado, quando foi classificado como não paramétrico realizou-se o teste de Wilcoxon, dessa forma pode-se comparar os dois tratamentos, considerando o valor de $\alpha > 0,05$. Os isolados foram classificados quanto sua à capacidade de formar biofilme de acordo com a metodologia aplicada por Yang *et al.* (2018), no qual o ponto de corte da densidade óptica (DOpc) foi definido como 3 vezes o desvio padrão somado da média da DO do controle negativo HB101. Quando a média de uma amostra foi $\leq \text{DOpc}$, $> \text{DOpc} \leq 2 * \text{DOpc}$, $> 2 * \text{DOpc} \leq 4 \text{ DOpc}$, $> 4 * \text{DOpc} \leq 8 * \text{DOpc}$, $> 8 * \text{DOpc} \leq 16 * \text{DOpc}$ e $> 16 * \text{DOpc}$, foram classificados como não produtora, fraca

produtora, moderada produtora, forte produtora, muito forte produtora e extremamente forte produtora de biofilme, respectivamente.

2.6 Teste de identificação da polimerização de actina

As células HeLa, originárias de câncer cervical, foram mantidas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, através de cultivos sucessivos, em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose) (Sigma-Aldrich # D6429) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma-Aldrich # F2561) e de 1% de Penicilina/Estreptomicina (PenStrep, Gibco # 15140-148). Após o desenvolvimento da monocamada celular na superfície do frasco, a cultura foi lavada com PBS e descolada com a adição de tripsina (0,25% de EDTA), seguida de agitação manual dos frascos. Posteriormente ao descolamento das células, foi adicionado DMEM com 10% SFB a fim de inativar a tripsina. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células foram novamente ressuspensas em meio de cultura para contagem em câmara de Neubauer. Após determinação do número de células, estas foram diluídas 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 1 mL por orifício. 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 gás carbônico por aproximadamente 48 horas, até atingirem 70% de confluência. O teste de polimerização da actina (*FAS-Fluorescence Actin Staining*) foi realizado segundo o descrito por Knutton *et al.* (1989). Os isolados bacterianos foram inoculados a partir de cultura em caldo LB por 18 horas à 37 °C, na diluição 1:50, em microplacas de 24 poços, contendo células HeLa em meio DMEM suplementado com 2% de SFB e 2% de D-manose (Sigma # M6020) e incubadas por um período de 3 horas. Em seguida, foram lavadas seis vezes com PBS estéril, fixadas em formaldeído a 3% em PBS, permeabilizadas com Triton X-100 a 1% (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) e incubadas, no escuro, com faloidina marcada com fluoresceína (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) na diluição de 1:125 e DAPI (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) na diluição de 1:500 por 20 min. As lamínulas foram lavadas em PBS, montadas em glicerol (diluído 1:9 em PBS) e observadas ao microscópio de fluorescência (Olympus BX60) em aumento de 1000X. Por outro lado, os isolados que não apresentaram o FAS positivo foram submetidos a ensaios de 6 horas. Nesse ensaio mais prolongado, após 3 horas de incubação, a microplaca foi lavada com PBS estéril e incubada por mais 3 horas com meio DMEM fresco (período de multiplicação). Após o período total de 6 horas, as preparações foram lavadas seis vezes com PBS estéril, em seguida, fixadas, coradas e analisadas conforme dito anteriormente. O protótipo de EPEC E2348/69 foi utilizado como controle positivo para

polimerização de actina (FAS positivo), enquanto o isolado de EAEC 042, produtor do padrão AA, foi utilizado como controle negativo (FAS negativo).

2.7 Determinação da via de indução da lesão AE: Tir-Nck e Tir-TccP/EspF_U

Os genes que codificam a proteína adaptadora TccP (*tccP* e *tccP2*) e a região da molécula de Tir que contém o resíduo de tirosina fosforilada foram pesquisados por PCR, empregando-se os iniciadores descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Iniciadores utilizados para pesquisa dos genes que codificam os subtipos da proteína adaptadora TccP e para a subtipagem do gene *tir*.

Genes	Primers (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>tccP</i>	CACCTTTTTTCACCAAGCAGTA GCCGAATGGGCGTTGG	50°C	Variável	Madic <i>et al.</i> , (2011)
<i>tccP2</i>	CACCTYTTTCTCCCAGCAACA GAAGTCCTGATTCTGTATAAGAATTTTTTACC	40°C	Variável	Madic <i>et al.</i> , (2011)
<i>tirY474</i>	CATATTTATGATGAGGTCGCTGC TAAAAGTTCAGATCTTGATGACAT	50°C	401 pb	Ogura <i>et al.</i> , (2007)
<i>tirS478</i>	TCTGTTTCTAGAATATGGGGAATA TAAAAGTTCAGATCTTGATGACAT	50°C	407 pb	Ogura <i>et al.</i> , (2007)

3. Resultados

Através da técnica de multiplex PCR, descrita por Clermont e colaboradores (2013, 2019) para a classificação dos isolados de *E. coli* nos distintos filogrupos identificados até o momento (A, B1, B2, C, D, E, F e G) (DENAMUR *et al.*, 2021), foi observado que todos os 8 isolados do sorotipo O3:H2 estudados (uma aEPEC, quatro EAEC e três híbridas de aEPEC/EAEC) foram classificados no filogrupo A.

Com relação ao perfil de virulência dos isolados do sorotipo O3:H2 estudados, além do gene *eae*, presente na região LEE e utilizado como marcador de diagnóstico de isolados de EPEC, os isolados de aEPEC e híbridos aEPEC/EAEC apresentaram os genes *nleC* e *nleF* (Tabela 6). Ademais, a respeito dos marcadores de EAEC identificados, os isolados de EAEC e híbridos aEPEC/EAEC apresentaram os genes *aap*, *orf3* e *aar*, além dos genes que codificam a pilina e o usher da AAF/I, *aggA* e *aggC*, respectivamente (Tabela 6). O gene *aatA* foi detectado em todos os quatro isolados de EAEC e em dois dos três isolados híbridos de aEPEC/EAEC (Tabela 6).

Tabela 6. Perfil de virulência dos isolados de *Escherichia coli* do sorotipo O3:H2.

Genes de Virulência		Localização do gene em genomas de referência ^{c,d}	Categoria de ECD:							
			aEPEC	EAEC				aEPEC/EAEC		
			IAL 7254	IAL 7250	IAL 7251	IAL 7255	IAL 7257	IAL 7252	IAL 7253	IAL 7256
Genes de virulência de EPEC ^a	<i>eae</i>	Cromossomo (Região LEE) ^c	+	-	-	-	-	+	+	+
	<i>nleC</i>	Cromossomo (PP4) ^c	+	-	-	-	-	+	+	+
	<i>nleF</i>	Cromossomo (PP6) ^c	+	-	-	-	-	+	+	+
Genes de virulência de EAEC ^b	<i>aggR</i>	pAA ^d	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>aatA</i>	pAA	-	+	+	+	+	+	-	+
	<i>aggA</i>	pAA	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>aggC</i>	pAA	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>aap</i>	pAA	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>orf3</i>	pAA	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>aar</i>	pAA	-	+	+	+	+	+	+	+

^aGenes de virulência de EPEC/STEC não detectados: *tccP*, *tccP2*, *paa*, *saa*, *efa1/lifA*, *cdt*, *espP*, *subAB*, *cnf*, *nleA/espL*, *nleB*, *nleD*, *nleE*, *espT*, *ibe* e *cif*.

^bGenes de virulência de EAEC não detectados: *aggA*, *aafA*, *agg3A*, *agg4A*, *agg5A* *aafC*, *agg3/4C*, *pic*, *pet*, *sepA*, *sigA*, *astA*, *aaiA*, *aaiC*, *aaiG*, *air*, *shf*, *capU*, *eibG* e *afpB*.

^cLocalização no cromossomo da amostra protótipos de EPEC típica E2348/69. PP: profago (IGUCHI *et al.*, 2009).

^dpAA: Plasmídeo de aderência agregativa (BOLL *et al.*, 2020).

Com base na extração plasmidial, realizada utilizando a técnica de lise alcalina, observou-se que os isolados de EAEC e híbridos de aEPEC/EAEC apresentam vários plasmídios de diferentes tamanhos, sendo o de maior peso molecular comum aos isolados de EAEC e híbridos de aEPEC/EAEC (Figura 1). Um plasmídio de peso molecular semelhante também pode ser observado no isolado protótipo de EAEC 042 que conhecidamente alberga o pAA2. Coletivamente, esses dados sugerem que o plasmídio de maior peso molecular, observado nos isolados de EAEC e híbridos aEPEC/EAEC seja o pAA.

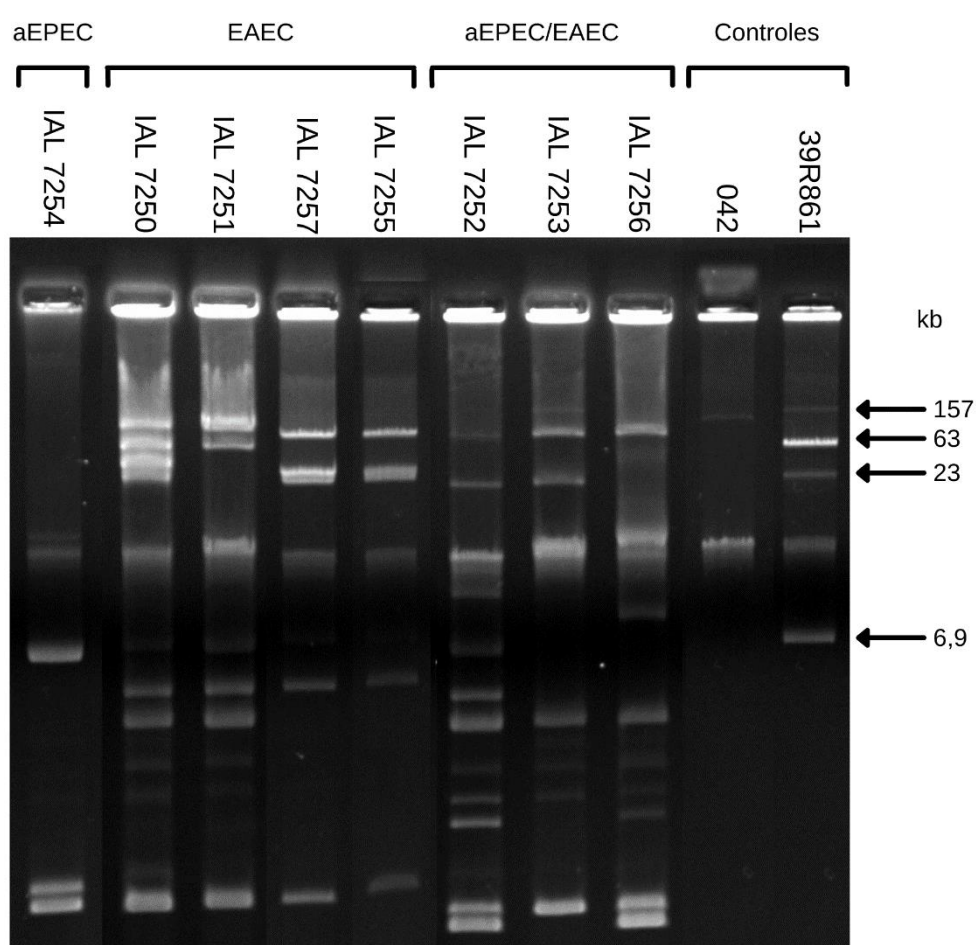


Figura 1. Perfil plasmidial dos isolados de *Escherichia coli* do sorotipo O3:H2. Note que os isolados de EAEC e híbridos de aEPEC/EAEC apresentam plasmídio de um mesmo tamanho, diferentemente da EPEC.

A capacidade dos isolados do sorotipo O3:H2 formar biofilme em superfícies de poliestireno foi avaliada na ausência e na presença de D-manose em 24 h. Esse experimento revelou que todos os isolados testados, exceto um (IAL 7257), apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na formação de biofilme quando os ensaios foram realizados na presença de D-manose (Figura 2).

No ensaio realizado sem D-manose, notou-se que todos os isolados das categorias aEPEC, EAEC e híbridos de aEPEC/EAEC foram capazes de formar biofilme em superfície abiótica. Examinando estes isolados do sorotipo O3:H2 quanto a capacidade de formar biofilme na presença de D-manose com a finalidade de excluir o papel da fímbria tipo I e, dessa maneira, melhor analisar o papel de outras adesinas no processo de formação do biofilme, observou-se que todos os isolados de EAEC e os híbridos de aEPEC/EAEC foram capazes de apresentar o fenótipo de biofilme nos mais diferentes graus, desde fraca produtora até muito forte produtora, assim como a protótipo de EAEC 042 (Figura 3). Em contrapartida, na cepa aEPEC IAL 7254, o fenótipo de biofilme foi inibido pela D-manose, semelhante ao controle negativo HB101, sendo estas, portanto, classificadas como não produtoras de biofilme (Figura 3).

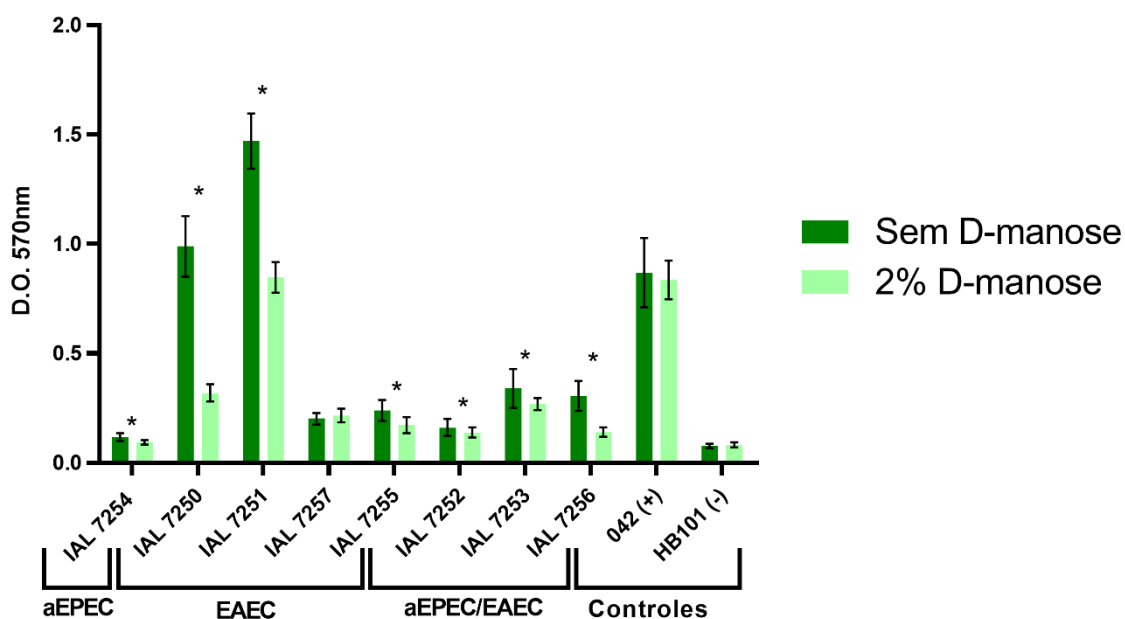


Figura 2. Produção de biofilme por isolados de *E. coli* do sorotipo O3:H2 em superfície de poliestireno na presença e ausência de D-manose. Os isolados que apresentam * no gráfico foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos, considerando o $P < 0,05$.

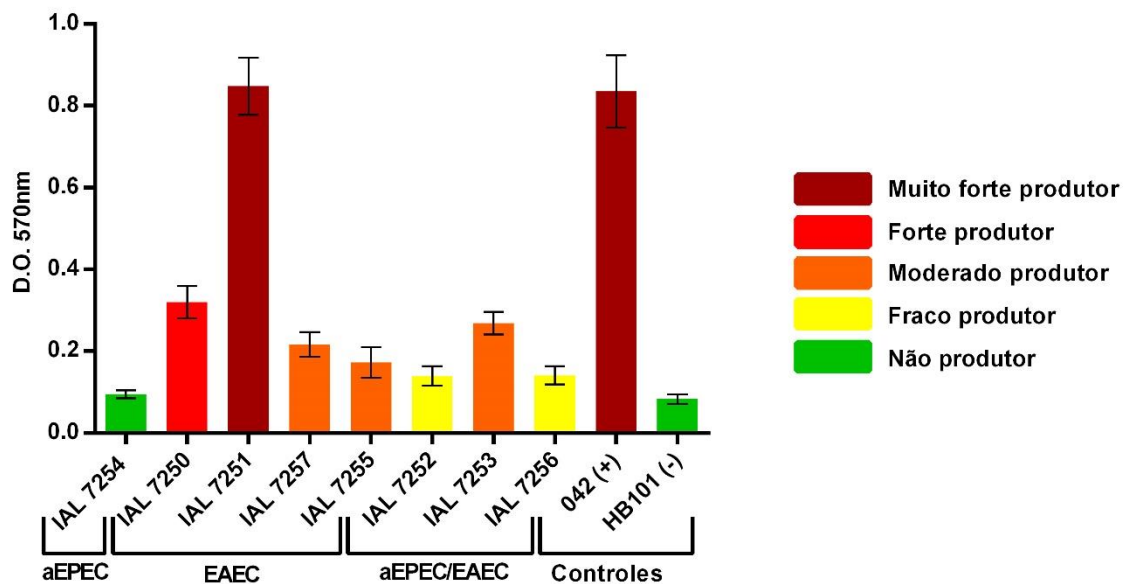


Figura 3. Classificação dos distintos graus de eficiência na formação de biofilme por isolados de *E. coli* do sorotipo O3:H2 na presença de D-manose. Note que somente o isolado de aEPEC IAL 7254, assim como o controle negativo HB101, não foram capazes de formar biofilme nas condições testadas.

Com o objetivo de avaliar se a região LEE dos isolados de aEPEC e híbridos de aEPEC/EAEC era funcional, esses isolados foram submetidos ao teste de FAS. Nenhum dos isolados mostraram positividade nos ensaios de 3 h de interação (Figura 4). No entanto, nos ensaios de 6 h, o isolado de aEPEC IAL 7254 não foi capaz de recrutar F-actina para a formação da lesão AE, por outro lado, os isolados híbridos de aEPEC/EAEC apresentaram o sinal de FAS, revelando a sua capacidade de polimerizar F-actina (Figura 4). É importante mencionar que dois destes isolados, IAL 7252 e IAL 7256, apresentaram positividade no teste de FAS de forma esporádica, *i.e.*, somente uma minoria das bactérias aderidas foram capazes de recrutar F-actina e esse fenótipo não foi consistente em todos os testes realizados, ao passo que no isolado híbrido IAL 7253 o acúmulo de F-actina foi evidente em vários campos do teste de FAS observados, e os resultados consistentes em todas as repetições realizadas. Outrossim, foi empregada a técnica de PCR para a tipagem do gene *tir* em *tirY474*, característico de EPEC, e *tirS478*, característico de STEC, além da pesquisa da presença dos genes *tccP* (*tccP1* e *tccP2*) para a determinação da via de indução da lesão AE. Observou-se que os isolados aEPEC e os híbridos aEPEC/EAEC apresentam o gene *tir* do subtipo *tirY474* e são desprovidos de *tccP*, sugerindo assim, que esses isolados recrutem F-actina pela via Tir-Nck.

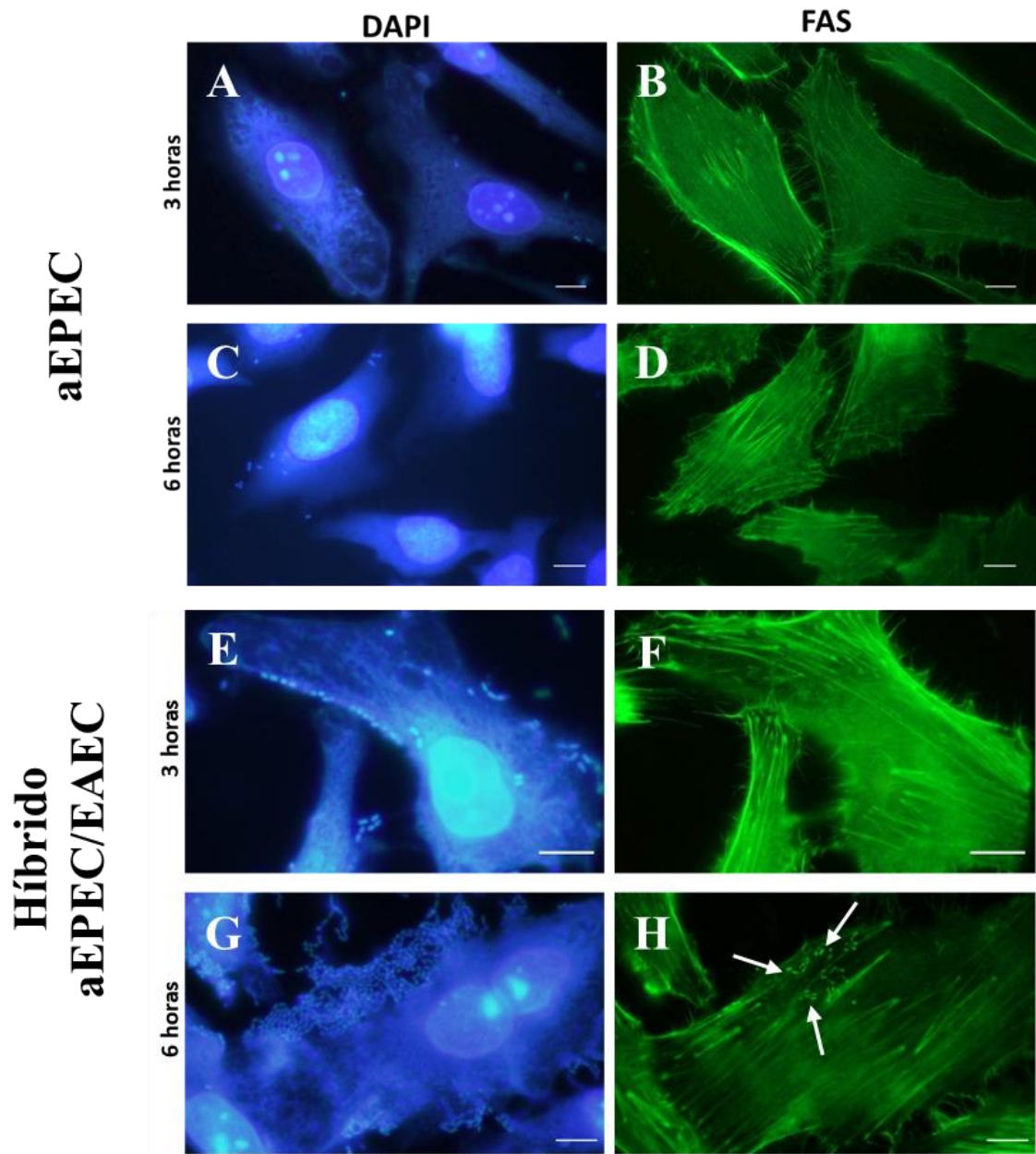


Figura 4. Imagens representativas da microscopia de fluorescência do teste realizado para a detecção da polimerização de F-actina (teste FAS) com os isolados de aEPEC IAL 7254 (A, B, C e D) e o híbrido IAL 7253 (E, F, G e H) em ensaios com 3 (A, B, E e F) e 6 (C, D, G e H) horas de incubação. As preparações foram coradas com DAPI (A, C, E e G) e faloidina (B, D, F e H) para a detecção das células epiteliais e bacterianas, bem como dos filamentos de F-actina, respectivamente. As setas indicam os locais onde há acúmulo de F-actina, característica principal da lesão AE. Barra = 10 μ m.

4. Discussão

Estudos epidemiológicos conduzidos no Brasil, bem como em outros países, têm identificado diversos patótipos de ECD em indivíduos com diarreia e em indivíduos saudáveis (DIAS *et al.*, 2016; GIOPPPO *et al.*, 2000; KOTLOFF *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2013). Sendo assim, o estudo de surtos compreende uma ferramenta chave para a identificação de isolados de ECD verdadeiramente patogênicos dos principais fatores de virulência associados à sua capacidade de causar danos ao hospedeiro humano. Durante o ano de 2010, o serviço de vigilância epidemiológica do Instituto Adolfo Lutz realizou a investigação de um surto de diarreia envolvendo um total de oito pacientes. Um isolado de *E. coli* foi selecionado de cada um dos pacientes envolvidos na presente investigação e a pesquisa dos marcadores clássicos de diagnóstico de ECD mostrou que um paciente estava infectado com aEPEC (*eae*⁺/*bfpB*⁺), quatro com EAEC (*aggR*⁺) e três com um híbrido de aEPEC/EAEC (*eae*⁺/*bfpB*⁺/*aggR*⁺), sendo todos os isolados pertencentes ao sorotipo O3:H2 (DE LIRA *et al.*, 2021).

A partir da identificação de isolados híbridos de aEPEC/EAEC, do sorotipo O3:H2, associados a um surto de diarreia no Brasil (DE LIRA *et al.*, 2021), surgiram perguntas importantes como qual seria a origem desses híbridos e como essa combinação de fatores de virulência entre EPEC e EAEC poderia influenciar a patogenicidade desses híbridos.

Embora inicialmente isolados de *E. coli* do filogruppo A eram descritos como pertencentes à microbiota humana (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000), hoje é notório que a maioria dos isolados de *E. coli* diarreiogênica dos patótipos aEPEC e EAEC são classificados nesse filogruppo (BANDO *et al.*, 2009; DIAS *et al.*, 2020; HERNANDES *et al.*, 2020; TOUCHON *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2016), indicando a alta plasticidade de isolados do filogruppo A na aquisição e retenção de genes de virulência, promovendo a emergência de novas combinações gênicas.

Para melhor compreendermos o arsenal de virulência presente em cada um dos isolados e quais fatores adicionais de virulência são compartilhados pelos isolados híbridos, foram pesquisados genes cromossômicos e plasmidiais que codificam importantes fatores associados a virulência de isolados de EPEC e EAEC. Além do gene *eae*, presente na região LEE e utilizado como marcador de diagnóstico de isolados de EPEC, os isolados de aEPEC e os híbridos de aEPEC/EAEC apresentaram os genes que codificam os efetores Não-LEE, NleC e NleF, sendo que este primeiro atua como uma protease efetora para inibir a resposta pró-inflamatória e o segundo tem o papel na inibição da fagocitose (SANTOS; FINLAY, 2015; WONG *et al.*, 2011). Tendo como base para nossa análise o protótipo de tEPEC E2348/69, os

genes *nleC* e *nleF* encontram-se localizados nos profagos 4 (PP4) e 6 (PP6), respectivamente, inseridos nos sítios *torS_torT* (PP4) e *ompW* do cromossomo da E2348/69 (IGUCHI *et al.*, 2009).

Com relação aos marcadores moleculares de patogenicidade de EAEC foi observado que todos os quatro isolados de EAEC, bem como os três híbridos de aEPEC/EAEC apresentam os genes *aap*, *orf3* e *aar*, sendo que este primeiro (*aap*) codifica uma proteína de antiagregação chamada dispersina. O gene *aatA* foi detectado em todos os quatro isolados de EAEC e em dois dos três isolados híbridos de aEPEC/EAEC. Ademais, foi identificado a presença do gene responsável por codificar a pilina (*aggA*) e o usher (*aggC*) de AAF-I. Muito embora a maioria dos isolados de EAEC do sorotipo O3:H2 alberguem genes relacionados com a biogênese de AAF/I (FRANÇA *et al.*, 2013), isolados de EAEC desse sorotipo albergando genes relacionados a biogênese das AAF/III (DIAS *et al.*, 2020; ZAMBONI *et al.*, 2004) e AAF/V (PETRO *et al.*, 2020) já foram reportados na literatura. É importante mencionar que nenhum dos isolados de O3:H2 analisadas no presente estudo albergam os genes pesquisados do operon cromossomal *aai* (*aaiA*, *aaiC* e *aaiG*), inicialmente caracterizado no isolado protótipo de EAEC 042.

Analisando coletivamente os genes de virulência pesquisados observou-se que os isolados de aEPEC e os híbridos aEPEC/EAEC compartilharam marcadores cromossomais (região LEE, *nleC* e *nleF*), enquanto os isolados de EAEC e os híbridos aEPEC/EAEC compartilharam apenas marcadores plasmidiais (*aggR*, *aatA*, *aggA*, *aggC*, *aap*, *orf3* e *aar*); o que fortemente sugere que o isolado de aEPEC tenha servido como receptor do pAA (albergando o operon que codifica a AAF/I), originando os isolados híbridos aEPEC/EAEC. Essa hipótese é reforçada quando se observa um plasmídio de alto peso molecular compartilhado entre os isolados de EAEC e os híbridos de aEPEC/EAEC.

Os biofilmes são comunidades bacterianas revestidas por uma matriz extracelular, possuindo uma fisiologia caracterizada por maior tolerância ao estresse, antimicrobianos e defesas imunológicas do hospedeiro, além de contribuir em infecções persistentes, sendo também mais resiliente na maioria dos ambientes médicos e industriais (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008). Notou-se que os isolados do sorotipo O3:H2 das categorias de EAEC e híbridos de aEPEC/EAEC foram capazes de formar biofilme nos mais diferentes graus na presença de D-manose, em contrapartida, o isolado de aEPEC IAL 7254, não foi capaz de produzir biofilme. Estes resultados sugerem que há participação de outras adesinas além da fímbria tipo I que contribuem para formação de biofilme, evidenciado nos isolados que albergam o pAA e são produtoras das AAFs. Como já foi demonstrado em estudos anteriores, as AAF são dispostas

como feixes de fibras que promovem interações entre as bactérias nos biofilmes formados por isolados de EAEC (CZECZULIN *et al.*, 1997; NATARO *et al.*, 1993). Os isolados de EAEC apresentam o fenótipo de biofilme robusto atribuído à presença de AAFs, apesar de distintas adesinas fimbriais e afimbriais que desempenham papéis menos significativos estarem presentes nesse grupo de isolados (AVELINO *et al.*, 2010; BOISEN *et al.*, 2020; CHAUDHURI *et al.*, 2010; MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003). Recentemente foi descrita uma nova adesina fimbrial, YehD, que se mostrou importante no papel de formação de biofilme na cepa 17-2, pois, aparenta agir sinergicamente com AAF/I e outras adesinas, para a produção de um biofilme mais robusto (SORIA-BUSTOS *et al.*, 2021).

O teste de FAS é utilizado para indicar de forma indireta, através da detecção do acúmulo de F-actina logo abaixo do sítio de aderência bacteriana, o potencial de isolados de *E. coli* portadores da região LEE em induzir a formação da lesão AE nas células infectadas (KNUTTON *et al.*, 1989). Neste ensaio, a faloidina combinada com isotiocianato de fluoresceína se liga a F-actina filamentosa das células epiteliais cultivadas, embaixo de cada bactéria aderida, revelando, assim, o acúmulo de F-actina que é uma das características marcantes da lesão AE (KNUTTON *et al.*, 1989). O fato dos híbridos de aEPEC/EAEC serem positivos no teste de FAS somente nos ensaios realizados com 6 h de incubação pode ser explicado pela ausência do operon *per*, localizado no pEAF característico das tEPEC, nos isolados de aEPEC. A ausência de *Per* na rede de regulação de genes de virulência é um dos principais fatores que retardam o estabelecimento da lesão AE por cepas que não albergam o plasmídio EAF, como as aEPEC, assim como foi demonstrado que ao inserir um plasmídio com *per*, as cepas de aEPEC passaram a causar a lesão AE em 3 horas de incubação, semelhante as tEPEC, devido ao aumento da transcrição de genes localizados na região LEE (BUERIS *et al.*, 2015). Por outro lado, a diferença no potencial em induzir a lesão AE nas células epiteliais pelos isolados híbridos poderia ser explicada por diferenças na expressão de genes da região LEE; enquanto a ausência desse fenótipo no isolado de aEPEC poderia ser justificada pela sua baixa aderência as células epiteliais, bem como sua incapacidade de produzir biofilme e consequentemente a não indução da expressão dos genes da região LEE por *quorum sensing*, resultando na ausência do acúmulo de F-actina nas células eucarióticas nos ensaios realizados em 3 e 6 horas de interação (SPERANDIO; LI; KAPER, 2002). As amostras aEPEC e os híbridos de aEPEC/EAEC apresentam o gene *tir* que alberga a sequência necessária para codificar a proteína Tir carreando o resíduo de Tirosina 474 (Tir-Y₄₇₄), que após ser fosforilado (Tir-YP) induz o recrutamento de F-actina pela via Tir-Nck, semelhantemente a do protótipo de tEPEC E2348/69 (DEVINNEY *et al.*, 2001; KENNY, 1999).

A partir dos resultados obtidos, os dados sugerem que um isolado de aEPEC tenha servido como receptor do pAA, originando, os híbridos de aEPEC/EAEC do sorotipo O3:H2. Ademais, esses híbridos compartilham propriedades fenotípicas características de ambos os patotipos, isto é, EPEC (lesão AE) e EAEC (biofilme), conferindo a esses híbridos um maior arsenal de virulência para colonizar e causar danos ao seu hospedeiro.

5. Referências

- ABE, C. M. *et al.* Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*⁺ EAF-negative *stx*⁻ genetic profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 357–365, ago. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.025>>.
- AFSET, J. E. *et al.* 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, n. 10, p. 3703–3711, 1 out. 2006. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00429-06>>.
- 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, nov. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.030>>.
- ARAUJO, J. M. *et al.* 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, n. 10, p. 3396–3399, 1 out. 2007. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00084-07>>.
- ARBELOA, A. *et al.* Distribution of *espM* and *espT* among enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 988–995, 1 ago. 2009. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.010231-0>>.
- 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.
- BAI, X. *et al.* Molecular Characterization and Comparative Genomics of Clinical Hybrid Shiga Toxin-Producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains in Sweden. **Scientific Reports**, v. 9, n. January, p. 1–9, 4 dez. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42122-z>>.
- BANDO, S. Y. *et al.* Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 299, n. 1, p. 22–30, 2009.
- BATISSON, I. *et al.* Characterization of the Novel Factor Paa Involved in the Early Steps of the Adhesion Mechanism of Attaching and Effacing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4516–4525, 1 ago. 2003. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.71.8.4516-4525.2003>>.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.-M. *Escherichia coli* Biofilms. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 322, p. 249–289, 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-75418-3_12>.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUENEC, C. Identification of an Aggregative Adhesion Fimbria (AAF) Type III-Encoding Operon in Enteropathogenic *Escherichia coli* as a Sensitive Probe for Detecting the AAF-Encoding Operon Family. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4302–4311, 1 ago. 2002. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.70.8.4302-4311.2002>>.

BHATNAGAR, S. *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli* may be a New Pathogen Causing Acute and Persistent Diarrhea. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 579–583, 8 jan. 1993. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365549309008546>>.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671–676, set. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309911701657>>.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513–1523, 24 nov. 1979. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00429704>>.

BOISEN, N. *et al.* High Prevalence of Serine Protease Autotransporter Cytotoxins among Strains of Enteropathogenic *Escherichia coli*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 294–301, 1 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2009.80.294>>.

BOISEN, N. *et al.* New Adhesin of Enteropathogenic *Escherichia coli* Related to the Afa/Dr/AAF Family. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3281–3292, 1 jul. 2008. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01646-07>>.

BOISEN, N. *et al.* Redefining enteropathogenic *Escherichia coli* (EAEC): Genomic characterization of epidemiological EAEC strains. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008613, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32898134>>.

BOLL, E. J. *et al.* Emergence of Enteropathogenic *Escherichia coli* within the ST131 Lineage as a Cause of Extraintestinal Infections. **mBio**, v. 11, n. 3, p. e00353-20, 19 jun. 2020. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00353-20>>.

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, 30 out. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762007000700009&lng=en&tlng=en>.

BUERIS, V. *et al.* Late Establishment of the Attaching and Effacing Lesion Caused by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Depends on Protein Expression Regulated by Per. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 1, p. 379–388, jan. 2015. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.02563-14>>.

BUSS, C. *et al.* Identification and characterization of Ibe, a novel type III effector protein of A/E pathogens targeting human IQGAP1. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 661–677, abr. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2009.01284.x>>.

CAVALCANTI *et al.* Virulence Profiling and Molecular Typing of Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) from Human Sources in Brazil. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 171, 25 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/2/171>>.

CHAUDHURI, R. R. *et al.* Complete Genome Sequence and Comparative Metabolic Profiling of the Prototypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain 042. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8801, 20 jan. 2010. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008801>>.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.

CLERMONT, OLIVIER *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, 28 ago. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1462-2920.14713>>.

CLERMONT, OLIVIER *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, fev. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1758-2229.12019>>.

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, p. e98103, 20 maio 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0098103>>.

DE LIRA, D. R. P. *et al.* Identification of a hybrid atypical enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* (aEPEC/EAEC) clone of serotype O3:H2 associated with a diarrheal outbreak in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 2–6, 26 ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-021-00580-6>>.

DENAMUR, E. *et al.* The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37–54, 21 jan. 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>>.

DEVINNEY, R. *et al.* Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 1445–1458, set. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2001.02617.x>>.

DIAS, R. C. B. *et al.* Analysis of the Virulence Profile and Phenotypic Features of Typical and Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolated From Diarrheal Patients in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. April, p. 1–10, 22 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00144/full>>.

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: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 124, n. 4, p. 299–308, abr. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/apm.12501>>.

DONNENBERG, M. S. *et al.* A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Molecular Microbiology**, v. 6, 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, set. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05281.x>>.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 281–298, dez. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2012.01008.x>>.

FRANÇA, F. L. S. *et al.* Genotypic and Phenotypic Characterisation of Enteroaggregative *Escherichia coli* from Children in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69971, 30 jul. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0069971>>.

GIOPPPO, 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, 15 set. 2000. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097\(00\)00352-9](http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097(00)00352-9)>.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 12–18, jan. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2005.00005.x>>.

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, out. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.024>>.

HAZEN, T. H. *et al.* Comparative genomics and transcriptomics of *Escherichia coli* isolates carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic *E. coli*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3513, 14 dez. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-03489-z>>.

HERNANDES, R. T. *et al.* An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, n. 2, p. 137–149, ago. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x>>.

HERNANDES, R. T. *et al.* Comparative genomic analysis provides insight into the phylogeny and virulence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008373, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0008373>>.

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, 1 set. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/505869>>.

- HÜTTENER, M. *et al.* Stringent Response and AggR-Dependent Virulence Regulation in the Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain 042. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–9, 10 abr. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00717/full>>.
- IGUCHI, A. *et al.* Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 Strain E2348/69. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 1, p. 347–354, 1 jan. 2009. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01238-08>>.
- IJIMA, Y. *et al.* High Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* among Children with Diarrhea in Kenya. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 70, n. 1, p. 80–83, 2017. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/70/1/70_JJID.2016.064/_article>.
- 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.
- JERSE, A. E. *et al.* A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, n. October, p. 7839–7843, 1990.
- 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, n. FEB, 2017.
- JØNSSON, R. *et al.* Novel Aggregative Adherence Fimbria Variant of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1396–1405, abr. 2015. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.02820-14>>.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro818>>.
- KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. Overview and Historical Perspectives. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 6, p. 1–5, 10 dez. 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9343-8_1>.
- KAPER, J. P. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 130–133, 1996.
- KARCH, H. *et al.* The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 9, p. 841–848, 24 set. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/emmm.201201662>>.
- 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, n. 4, p. 1229–1241, fev. 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1999.01265.x>>.
- KNUTTON, S. *et al.* Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 4, p. 1290–1298, abr. 1989. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.57.4.1290-1298.1989>>.
- KOTLOFF, K. L. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective,

case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209–222, jul. 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)>.

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, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0209-8>>.

LIMA, A. A. M. *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, p. e0007154, 8 fev. 2019. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007154>>.

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. Pt_5, p. 683–693, 1 maio 2013. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.054262-0>>.

MADIC, J. *et al.* Duplex real-time PCR detection of type III effector *tccP* and *tccP2* genes in pathogenic *Escherichia coli* and prevalence in raw milk cheeses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 538–545, maio 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2011.03038.x>>.

MCDANIEL, T. K. *et al.* A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 5, p. 1664–1668, 28 fev. 1995. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.92.5.1664>>.

MELLMANN, A. *et al.* Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22751, 20 jul. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022751>>.

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, ago. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-5822.2003.00299.x>>.

MOON, H. W. *et al.* Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340–1351, set. 1983. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.41.3.1340-1351.1983>>.

MORIN, N. *et al.* Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 344–355, abr. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2009.00645.x>>.

NATARO, J. P. *et al.* Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 3, p. 1126–1131, 1993.

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. 829–31, set. 1987. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00006454-198709000-00008>>.

NATARO, JAMES P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457432>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC121379>>.

NATARO, JAMES 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.

NATARO, JAMES 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.

NICHOLLS, L.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 275–288, jan. 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2000.01690.x>>.

NYHOLM, O. *et al.* Hybrids of Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Among Human and Animal Isolates in Finland. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 7, p. 518–524, nov. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/zph.12177>>.

OGURA, Y. *et al.* TccP2 of O157:H7 and Non-O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Challenging the Dogma of EHEC-Induced Actin Polymerization. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 604–612, 1 fev. 2007. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01491-06>>.

OKEKE, I. N. *et al.* Heterogeneous Virulence of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Children in Southwest Nigeria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 252–260, jan. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315204>>.

OLIVEIRA-GARCIA, D. *et al.* Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 625–636, set. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-5822.2003.00306.x>>.

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, n. e10, p. 1–9, 19 set. 2019. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268818002595/type/journal_article>.

PATON, A.; PATON, J. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.

PATON, A. W. *et al.* A New Family of Potent AB5 Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic *Escherichia coli*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 1, p. 35–46, 5 jul. 2004. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/200/1/35/40094/A-New-Family-of-Potent-AB5-Cytotoxins-Produced-by>>.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 271–274, 2002.

PETRO, C. D. *et al.* Genetic and Virulence Profiles of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolated From Deployed Military Personnel (DMP) With Travelers' Diarrhea. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. May, 20 maio 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00200/full>>.

PRAGER, R. *et al.* Two Novel EHEC/EAEC Hybrid Strains Isolated from Human Infections. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95379, 21 abr. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095379>>.

PRIETO, A. *et al.* Modulation of AggR levels reveals features of virulence regulation in enteroaggregative *E. coli*. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1295, 16 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s42003-021-02820-9>>.

RASKO, D. A. *et al.* Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic–Uremic Syndrome in Germany. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 8, p. 709–717, 25 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1106920>>.

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, 1 mar. 2007. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01542-06>>.

RODRIGUES, J. *et al.* Clonal Structure and Virulence Factors in Strains of *Escherichia coli* of the Classic Serogroup O55. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2680–2686, 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1128/iai.64.7.2680-2686.1996>>.

SANTOS, A. S.; FINLAY, B. B. Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 318–332, mar. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12412>>.

SAVARINO, S. J. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 7, p. 3093–3097, 1 abr. 1993. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.90.7.3093>>.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive Patterns of Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa Cells. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 2, p. 534–536, 1984.

SHIN, J. *et al.* An Outbreak of Foodborne Illness Caused by Enteroaggregative *Escherichia coli* in a High School in South Korea. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 68, n. 6, p. 514–519, 2015. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/68/6/68_JJID.2014.460/_article>.

SORIA-BUSTOS, J. *et al.* Role of the YehD fimbriae in the virulence-associated properties of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology**, v. 00, p. 1462–2920.15737, set. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.15737>>.

SPERANDIO, V.; LI, C. C.; KAPER, J. B. Quorum-Sensing *Escherichia coli* Regulator A: a Regulator of the LysR Family Involved in the Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement Pathogenicity Island in Enterohemorrhagic *E. coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 3085–3093, jun. 2002. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.70.6.3085-3093.2002>>.

SZALO, I. M. *et al.* Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 653–658, dez. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250802013797>>.

TENNANT, S. M. *et al.* Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 117, 2009. Disponível em: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-117>>.

TOTH, I. *et al.* Production of Cytolethal Distending Toxins by Pathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Human and Animal Sources: Establishment of the Existence of a New *cdt* Variant (Type IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4285–4291, 1 set. 2003. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.41.9.4285-4291.2003>>.

TOUCHON, M. *et al.* Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. **PLoS Genetics**, v. 16, n. 6, p. 1–43, 12 jun. 2020. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1008866>>.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508–513, maio 2002. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/5/01-0385_article.htm>.

VIEIRA, M. A. *et al.* Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiological agents of sporadic and outbreak-associated diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 998–1006, 1 set. 2016. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000313>>.

VIEIRA, M. A. *et al.* Diversity of strategies used by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to induce attaching and effacing lesion in epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 940–951, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000998>>.

WERBER, D. *et al.* Outbreaks of virulent diarrheagenic *Escherichia coli*- are we in control? **BMC Medicine**, v. 10, n. 1, p. 11, 2 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/11>>.

WONG, A. R. C. *et al.* Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1420–1438, jun. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x>>.

YANG, X. *et al.* Biofilm formation and susceptibility to biocides of recurring and transient *Escherichia coli* isolated from meat fabrication equipment. **Food Control**, v. 90, p. 205–211, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.050>>.

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, 1 mar. 2004. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.42.3.1058-1063.2004>>.

Conclusão

CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que um isolado de aEPEC do sorotipo O3:H2 serviu como receptor de um plasmídio de alto peso molecular carregando o operon *aggDCBA* (pAA), culminando com o surgimento de isolados híbridos de aEPEC/EAEC, que foram responsáveis por um surto de diarreia em nosso país. Ademais, os isolados híbridos foram capazes de combinar características fenotípicas de virulência de ambos os patótipos de ECD, tais como: induzir a lesão AE em células epiteliais infectadas (fenótipo característico dos isolados de EPEC) e formar biofilme em superfícies abióticas (fenótipo característico de EAEC). No entanto, se esses isolados híbridos seriam mais patogênicos, e consequentemente capazes de causar infecções mais severas no hospedeiro humano, é uma questão que ainda não foi esclarecida.