

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

CAROLINE GASTALDI GUERRIERI

**RELAÇÃO GENÉTICA E POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE  
ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA DE  
CRIANÇAS DE COMUNIDADES QUILOMBOLAS**

VITÓRIA

2018

CAROLINE GASTALDI GUERRIERI

**RELAÇÃO GENÉTICA E POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE  
ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA DE  
CRIANÇAS DE COMUNIDADES QUILOMBOLAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liliana Cruz Spano  
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck

VITÓRIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)  
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

---

G935r Guerrieri, Caroline Gastaldi, 1993 -  
Relação genética e potencial de virulência de isolados de Escherichia coli enteroagregativa de crianças de comunidades quilombolas / Caroline Gastaldi Guerrieri - 2018.  
107 f. : il.

Orientador: Liliana Cruz Spano.  
Coorientador: Ricardo Pinto Schuenck.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Heterogeneidade Genética. 2. Virulência. 3. Criança. I. Spano, Liliana Cruz. II. Schuenck, Ricardo Pinto. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO

A mestranda Caroline Gastaldi Guerrieri apresentou a dissertação intitulada "POTENCIAL DE VIRULÊNCIA *in vivo* E RELAÇÃO GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA DE CRIANÇAS DE COMUNIDADES QUILOMBOLAS" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação habilitando a farmacêutica CAROLINE GASTALDI GUERRIERI a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 22 de fevereiro de 2018.

Prof.ª Dr.ª Ana Paula Ferreira Nunes  
(Membro Interno)

Prof.ª Dr.ª Roxane Maria Fortes Piazza  
(Membro Externo)

Prof.ª Dr.ª Lilliana Cruz Spano  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre comigo, iluminando meus caminhos e me dando forças para alcançar os meus objetivos.

À minha família e amigos, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos. Em especial à minha mãe, Angela, por todo amor e carinho e por nunca ter medido esforços para me dar toda a estrutura que eu precisei.

Ao meu marido, Gustavo, pelo amor, companheirismo e compreensão.

À minha orientadora, Profa. Dra. Liliana Cruz Spano, pela paciência, dedicação e excelente orientação que tornaram possíveis a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck, pela grande contribuição na realização deste trabalho.

À banca examinadora, Dra Roxane Maria Fontes Piazza e Dra Ana Paula Ferreira Nunes pela disponibilidade e contribuição.

Ao Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos por ter me recebido em seu laboratório e contribuído muito com o desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Junior por ter nos cedido a cepa referência de EAEC atípica.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, por contribuírem para a minha formação.

À Dra Monalessa Fábila Pereira por todo auxílio e paciência na realização dos experimentos com *Galleria mellonella*.

Aos amigos do LabViG, especialmente à Luciana, Lays, Mariana, Izabella e Núbila, pela amizade e pelo auxílio nos experimentos.

Às amigas do LabCAS e RESBAC pelo auxílio nos experimentos e pelos momentos de descontração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

*Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é um patotipo emergente responsável por diarreia aguda e persistente, caracterizado por marcante heterogeneidade quanto aos potenciais fatores de virulência entre os isolados. EAEC pode ser classificada em típica (tEAEC) e atípica (aEAEC) com base na presença do regulon AggR, sugerindo-se uma maior virulência para tEAEC, embora aEAEC esteja relacionada a surtos de diarreia. Tivemos como objetivo determinar a relação genética e o potencial de virulência *in vivo* de isolados de tEAEC e aEAEC de crianças de comunidades quilombolas. Para análise da heterogeneidade clonal, empregamos a técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão com enzima de restrição *Xba*I em 73 amostras previamente caracterizadas quanto ao repertório de genes de virulência. A virulência de 20 amostras de EAEC (10 tEAEC e 10 aEAEC) além de cepas referência de tEAEC (EAEC 042), aEAEC (C1096) e *E. coli* não patogênica HB101 foi investigada em modelo de *Galleria mellonella*. Foi analisada a sobrevivência das larvas após inoculação de  $10^4$  a  $10^7$  UFC/larva e determinada a carga bacteriana da hemolinfa após inoculação de  $10^5$  UFC/larva das cepas referência, em diferentes períodos após infecção. Além disso, avaliamos características fenotípicas de virulência de 10 amostras de EAEC, (produção de enzimas, sideróforos e de biofilme). Para análise epidemiológica a nível global, 10 isolados foram submetidos à tipagem molecular pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Evidenciamos 58 pulsotipos distintos e sem relação com o perfil de genes de virulência e a comunidade de origem, para a maior parte das amostras. No modelo de *G. mellonella*, observamos que: (i) mortalidade das larvas foi dependente da concentração inoculada de tEAEC e aEAEC; (ii) cepas e amostras de aEAEC foram tão virulentas quanto de tEAEC, porém, a virulência média foi maior para as tEAEC; (iii) Não houve relação entre número de genes de virulência e a virulência no modelo; (iv) em contraposição às cepas EAEC 042 e EAEC C1096, a cepa *E. coli* HB101 não provoca melanização e é eliminada da hemolinfa com 2 horas após infecção. Em relação às características fenotípicas de virulência: (i) nenhuma amostra produziu fosfolipase, protease ou esterase; (ii) apenas uma amostra produziu hemolisina; (iii) todas as amostras analisadas produziram sideróforos; (iv) somente uma amostra não produziu biofilme. As 10 amostras analisadas pelo MLST pertencem a STs distintos e, portanto, representam diferentes linhagens evolutivas.

Os STs: 443, 730, 1178, 1286 e 2481, detectados nas nossas amostras, não haviam sido descritos para EAEC até o momento. Em conclusão, os resultados obtidos demonstram uma alta heterogeneidade de EAEC nas comunidades quilombolas mesmo estas sendo semi-isoladas, visto que a maior parte das amostras não apresentou relação genotípica entre si. Além disso, novos STs foram observados em amostras de EAEC e ao contrário do que se sugere na literatura, pelo modelo de estudo, as aEAEC podem ser tão virulentas quanto as tEAEC.

Palavras-chave: EAEC, heterogeneidade, *Galleria mellonella*, virulência.



## ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an emerging pathotype responsible for acute and persistent diarrhea. It is characterized by high heterogeneity of the potential virulence factors among the isolates. EAEC can be classified as typical (tEAEC) and atypical (aEAEC) based on the presence of the AggR regulon, suggesting a higher virulence for tEAEC, although the aEAEC is related to outbreaks of diarrhea. We aimed to determine the genetic relationship and *in vivo* virulence potential of tEAEC and aEAEC isolates from children of quilombola communities. To analyze the clonal diversity, we used the electrophoresis pulsed field gel electrophoresis (PFGE) after digestion with *Xba*I restriction enzyme in 73 strains previously characterized according to the repertoire of virulence genes. The virulence of 20 EAEC strains (10 tEAEC and 10 aEAEC) in addition to reference strains of tEAEC (EAEC 042), aEAEC (C1096) and non-pathogenic *E. coli* HB101 was investigated with *Galleria mellonella* model. The survival of the larvae was analyzed after inoculation of  $10^4$  to  $10^7$  CFU/larvae and the bacterial load in the hemolymph was determined after inoculation of  $10^5$  CFU/larvae of the reference strains, at different periods after infection. In addition, we evaluated phenotypic characteristics of virulence of 10 EAEC isolates (enzyme, siderophores and biofilm production). For epidemiological analysis at the global level, 10 isolates were submitted to molecular typing using the Multilocus Sequence Typing (MLST). We observed 58 distinct pulsotypes, with no relationship between the virulence gene profile and the community of origin, for most of the strains. Concerning *G. mellonella* model, we observe: (i) mortality of the larvae was dependent on the inoculated concentration of tEAEC and aEAEC; (ii) strains of aEAEC were as virulent as those of tEAEC, but the mean virulence was higher for tEAEC; (iii) There was no relationship between the number of virulence genes and the *in vivo* virulence; (iv) in contrast to EAEC 042 and EAEC C1096, *E. coli* HB101 does not cause melanization and is eliminated from the haemolymph at 2 hours post infection. Regarding the phenotypic characteristics of virulence: (i) no strain produced phospholipase, protease or esterase; (ii) only one strain produced haemolysin; (iii) all analyzed strains produced siderophores; (iv) only one strain did not produce biofilm. The 10 isolates analyzed by MLST belong to distinct STs and, therefore, represent different evolutionary lineages. The STs: 443, 730, 1178, 1286 and 2481, detected in our strains, had not been described for EAEC

to date. In conclusion, the results obtained demonstrate a high heterogeneity of EAEC from quilombola communities, even though they are semi-isolated, since most of the strains had no genotypic relationship between them. In addition, new STs were observed in EAEC strains and, in contrast to what is suggested in the literature, in the model of the study, aEAEC may be as virulent as tEAEC.

Keywords: EAEC, heterogeneity, *Galleria mellonella*, virulence

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Aderência agregativa

AAF - Fímbrias de aderência agregativa

aEAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa atípica

CAS - Ágar chrome azurol S

CC – Complexo clonal

CLS - *Cell lysis solution*

CSB - *Cell Suspension Buffer*

DAEC - *Escherichia coli* de aderência difusa

DEC - Patotipos diarreiogênicos de *Escherichia coli*

DMEM - Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

DNA - Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

dNTP – Desoxirribonucleotídeos

DO – Densidade óptica

DP – Desvio padrão

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EAST1 - Enterotoxina termoestável de EAEC (*Enteroaggregative heat stable toxin*)

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético (*Ethylene Diamine Tetracetic acid*)

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

EtBr – Brometo de etídio

EUA – Estados Unidos da América

ExPEC - *Escherichia coli* patogênica extra intestinal (*Extraintestinal pathogenic E. coli*)

HEp-2 - Células epiteliais humanas tipo 2

Hly - Hemolisina (*Hemolysin*)

LB – Caldo Luria Bertani

Lesão A/E - lesão *attaching and effacing*

LPS - Lipopolissacarídeo

LT - Toxina termolábil

MLST - *Multilocus Sequence Typing*

NMEC - *Escherichia coli* associada à meningite neonatal

PA - Puro para análise

pAA - Plasmídeo de aderência agregativa (*Plasmid Aggregative Adherence*)

pb- Pares de base

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em cadeia pela polimerase (*Polymerase chain reaction*)

Pet - Toxina codificada por plasmídeo (*Plasmid-encoded toxin*)

PFGE - Eletroforese em campo pulsado (*Pulsed field gel electrophoresis*)

Pic - Proteína envolvida na colonização intestinal (*Protein involved in intestinal colonisation*)

SDS - Dodecil sulfato de sódio

ShET 1 - Enterotoxina de *Shigella* 1 (*Shigella enterotoxin 1*)

SPATEs - Serino-proteases autotransportadas de *Enterobacteriaceae* (*Serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae*)

ST - *Sequence Typing*

ST - Toxina termoestável

Stx - Toxina de Shiga

TBE - Tampão Tris-borato EDTA

TE - Tampão Tris-EDTA

tEAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa típica

Tris - Tris (hidroximetil)aminometano

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

*Xba*I - *Xanthomonas badrii* enzima de restrição

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema da patogênese dos seis patotipos DEC. (Adaptado de KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).....20
- Figura 2** - Padrão de aderência agregativa em células HEP-2, na forma de “tijolo empilhado” (NATARO, 2004).....21
- Figura 3** - Fatores de virulência de EAEC (Adaptado de ESTRADA-GARCIA, NAVARRO-GARCIA, 2012).....22
- Figura 4** - Estágios da patogênese de EAEC. (Adaptado de <http://pt.slideshare.net/Wishofnight13/master-thesis-presentation-11402753>).....24
- Figura 5** - Mapa do Espírito Santo, com destaque para os municípios do norte do estado Conceição da Barra (norte) e São Mateus (sul) com localização estimada (círculos vermelhos) das comunidades Quilombolas do Norte do Espírito Santo de onde foram obtidas as amostras de EAEC; mapa de satélite da comunidade Angelim II, evidenciando a distribuição das moradias (Adaptado de LOZER, 2011).....34
- Figura 6** - Fluxograma dos ensaios realizados no presente estudo (em vermelho) e em estudos anteriores de nosso laboratório (em azul).....35
- Figura 7** - Fluxograma simplificado da técnica de PFGE.....36
- Figura 8** - Fluxograma dos ensaios de virulência em larvas de *Galleria mellonella*. À esquerda representa a análise de sobrevivência e à direita, a determinação da carga bacteriana na hemolinfa.....39
- Figura 9** - Foto ilustrativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando alguns dos padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de EAEC.....46
- Figura 10** - Dendograma gerado pelo software "GelJ" das 73 amostras de EAEC com as respectivas comunidades quilombolas de origem.....47

<b>Figura 11</b> - Perfil de PFGE, genes de virulência e comunidade de origem de amostras pertencentes ao mesmo pulsotipo.....	48
<b>Figura 12</b> - Dendograma e perfil genético das amostras de tEAEC (em negrito) e aEAEC analisadas no ensaio de virulência em <i>G. mellonella</i> .....	50
<b>Figura 13</b> - Larva de <i>G. mellonella</i> : A) não inoculada; B) após 96 h de infecção com a cepa <i>E. coli</i> não patogênica HB101; C) após 96 h de infecção com isolado de EAEC.....	51
<b>Figura 14</b> - Gráficos das curvas de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> inoculadas com os vinte isolados de EAEC na concentração de 105 UFC/larva. A) Curvas de sobrevivência individualizadas por amostra inoculada, com as linhas contínuas representando as tEAEC e linhas tracejadas, as aEAEC. B) Curva de sobrevivência por grupos de amostras tEAEC e aEAEC ( $p = 0,04$ ) .....	52
<b>Figura 15</b> - Percentual de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> após 96h de infecção com os isolados de EAEC na concentração 105 UFC/larva. Dados obtidos de três experimentos independentes e expressos como a média $\pm$ DP. EAEC típicas representadas em preto e EAEC atípicas em cinza. ....	53
<b>Figura 16</b> - A) Curvas de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> inoculadas com as cepas referência na concentração de 105 UFC/larva. B) Quantificação da carga bacteriana na hemolinfa em 0, 2, 4, 6 e 24 h após a infecção com as cepas referência na concentração 105 UFC/larva. Cepas referência: EAEC 042 (típica), EAEC C1096 (atípica) e <i>E. coli</i> não patogênica HB101.....	54
<b>Figura 17</b> - Detecção da produção de sideróforos por amostras de EAEC evidenciando o halo e a colônia.....	55
<b>Figura 18</b> - Produção de sideróforos pelas amostras de EAEC analisadas e comparação entre os grupos tEAEC e aEAEC.....	56
<b>Figura 19</b> - Resultado do ensaio de formação de biofilme corado com cristal violeta e comparação entre os grupos tEAEC e aEAEC. Cepas utilizadas como controle: EAEC 042 (tEAEC), EAEC 17-2 (tEAEC), HB101 ( <i>E. coli</i> não patogênica).....	57

**Figura 20** - Países onde já foram descritos os STs de *E. coli* encontrados em nosso estudo. Setas vermelhas indicam os países onde os STs foram descritos para EAEC (Itália – ST40, Reino Unido – ST 40 e ST200, Tailândia - ST40 e ST200, Bangladesh – ST 200 e Nigéria – ST144 e 453).....61



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Perfil de genes de virulência das amostras aleatoriamente selecionadas para o ensaio de virulência (MONFARDINI, 2012).....	37
<b>Quadro 2</b> - Classificação do índice Pz (PRICE, WILKINSON, GENTRY, 1982).....	40
<b>Quadro 3</b> - Mistura de reagentes para PCR para detecção dos genes analisados na técnica de MLST.....	42
<b>Quadro 4</b> - Iniciadores e condições de amplificação dos genes analisados na técnica de MLST.....	43
<b>Quadro 5</b> - Mistura de reagentes utilizados na reação de sequenciamento.....	44
<b>Quadro 6</b> - Condições de amplificação da reação de sequenciamento.....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais fatores de virulência de EAEC.....	22
<b>Tabela 2</b> - Resultados do <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) de 10 amostras de EAEC.....	58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.2 <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC) .....	20
2.2.1 Caracterização .....	20
2.2.2 Fatores de virulência, patogênese e manifestações clínicas .....	21
2.2.3 Modelos utilizados para estudos de patogênese de EAEC .....	26
2.3 <i>Galleria mellonella</i> .....	27
2.3 Análise de diversidade bacteriana .....	29
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Objetivo Geral .....	33
4.2 Objetivos específicos .....	33
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
5.1 Caracterização das amostras bacterianas .....	34
5.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão com enzima de restrição .....	35
5.3 Ensaio de virulência em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	37
5.3.1 Análise de sobrevivência de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com isolados de EAEC .....	38
5.3.2 Determinação da carga bacteriana na hemolinfa após a infecção .....	38
5.4 Caracterização fenotípica de fatores de virulência .....	39
5.4.1 Ensaio de produção de enzimas hidrolíticas e sideróforos .....	40
5.4.2 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica .....	40
5.5 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) .....	41
5.5.1 Amplificação dos genes por PCR .....	41
5.5.2 Purificação do produto de PCR .....	44
5.5.3 Reação de sequenciamento .....	44
5.5.4 Purificação da reação de sequenciamento .....	45
5.5.5 Determinação do ST .....	45
5.6 Análise estatística .....	45
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>

6.1 Eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão com enzima de restrição .....	46
6.2 Ensaio de virulência em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	51
6.3 Caracterização fenotípica de fatores de virulência .....	55
6.3.1 Ensaio de produção de enzimas hidrolíticas .....	55
6.3.2 Ensaio de produção de sideróforos .....	55
6.3.3 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica .....	56
6.4 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) .....	58
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO 3.....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A diarreia é considerada a segunda causa de mortalidade em crianças menores de cinco anos no mundo e pode ser classificada em aguda ou persistente conforme duração inferior ou superior a 14 dias, respectivamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Embora sejam vários os agentes etiológicos da diarreia de natureza infecciosa, os bacterianos se sobressaem em especial nos países em desenvolvimento e, dentre eles, os patótipos diarreio gênicos de *Escherichia coli* (DEC) são um dos principais contribuintes (CROXEN et al., 2013).

*E. coli* enteroagregativa (EAEC), um dos seis patótipos diarreio gênicos de *E. coli*, tem sido o mais frequentemente encontrado como causa de diarreia aguda e persistente, em pessoas de todas as idades em diversas regiões do mundo e também no Brasil, incluindo estudos com crianças com diarreia atendidas no Hospital Estadual Infantil de Vitória e em crianças quilombolas do Norte do Espírito Santo (BANGAR, MAMATHA, 2008; SPANO et al., 2008; MORENO et al., 2010; OKHUUSEN, DUPONT, 2010; AMAYA et al., 2011; LOZER et al., 2013; SPANO et al., 2017).

Sua patogênese é dividida em três etapas principais: (i) adesão inicial à superfície da mucosa, (ii) formação de biofilme, e (iii) indução de resposta inflamatória e liberação de toxinas (HARRINGTON, DUDLEY, NATARO, 2005; NAVARRO-GARCIA et al., 2010; JENSEN et al., 2014). Porém, os fatores de patogenicidade como adesinas, capacidade de produção de biofilme e toxinas, não estão uniformemente presentes entre as amostras de EAEC isoladas de diferentes áreas geográficas e nem em uma mesma área geográfica, o que faz esse patótipo ser caracterizado por uma grande heterogeneidade (OKEKE et al., 2000; SUZART et al., 2001; SARANTUYA et al., 2004; UBER et al., 2006; OKEKE et al., 2010). Metodologias moleculares para inferir diversidade bacteriana, como *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) e *multilocus sequence typing* (MLST) tem sido utilizadas para analisar essa heterogeneidade de EAEC tanto a nível local quanto a nível global, respectivamente (KAHALI et al., 2004; REGUA-MANGIA et al., 2009; OKEKE et al., 2010).

EAEC pode ser classificada em típica (tEAEC) e atípica (aEAEC) com base na presença do regulon *AggR*. Estudos sugerem que as amostras de tEAEC sejam

mais virulentas e, portanto, mais propensas a causar diarreia do que as aEAEC (SARANTUYA et al., 2004; MORIN et al., 2013). No entanto, aEAEC também tem sido relatada como um patógeno entérico de surtos (COBELJÍĆ et al., 1996; ITOH et al., 1997). Porém, nenhum estudo até o momento avaliou diferença de virulência em modelos *in vivo* entre tEAEC e aEAEC, sendo ainda necessário elucidar se existe diferença na patogenicidade entre esses dois grupos e entre aquelas com maior repertório de genes de virulência. Diversos estudos utilizam modelos animais, principalmente roedores, como forma de elucidar aspectos da patogênese de EAEC (MORIN et al., 2010; ROCHE et al., 2010). Nos últimos anos, por questões éticas e de menores custos, têm-se implementado o uso de modelos invertebrados para estudos de diversos microrganismos, até mesmo para EAEC (FRANÇA et al., 2013; JØNSSON et al., 2016; KHALIL et al., 2016). Nesse contexto, as larvas de *Galleria mellonella* têm sido utilizadas por apresentar diversas vantagens, tanto morfológicas quanto fisiológicas e imunológicas, frente a outros modelos animais (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012; TSAI, LOH, PROFT, 2016).

As enzimas podem desempenhar um papel importante na patogênese de EAEC, como as proteases, visto que seu efeito citotóxico envolve a secreção de *serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae* (SPATEs), e a hemolisina, que provoca citotoxicidade pela formação de poros na membrana da célula hospedeira (GUIGNOT et al., 2000; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014). Enzimas como a fosfolipase, descrita como importantes para a patogênese de outros microrganismos por degradarem constituintes das membranas celulares - os fosfolípidios (RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2016), ainda não foram analisadas em EAEC.

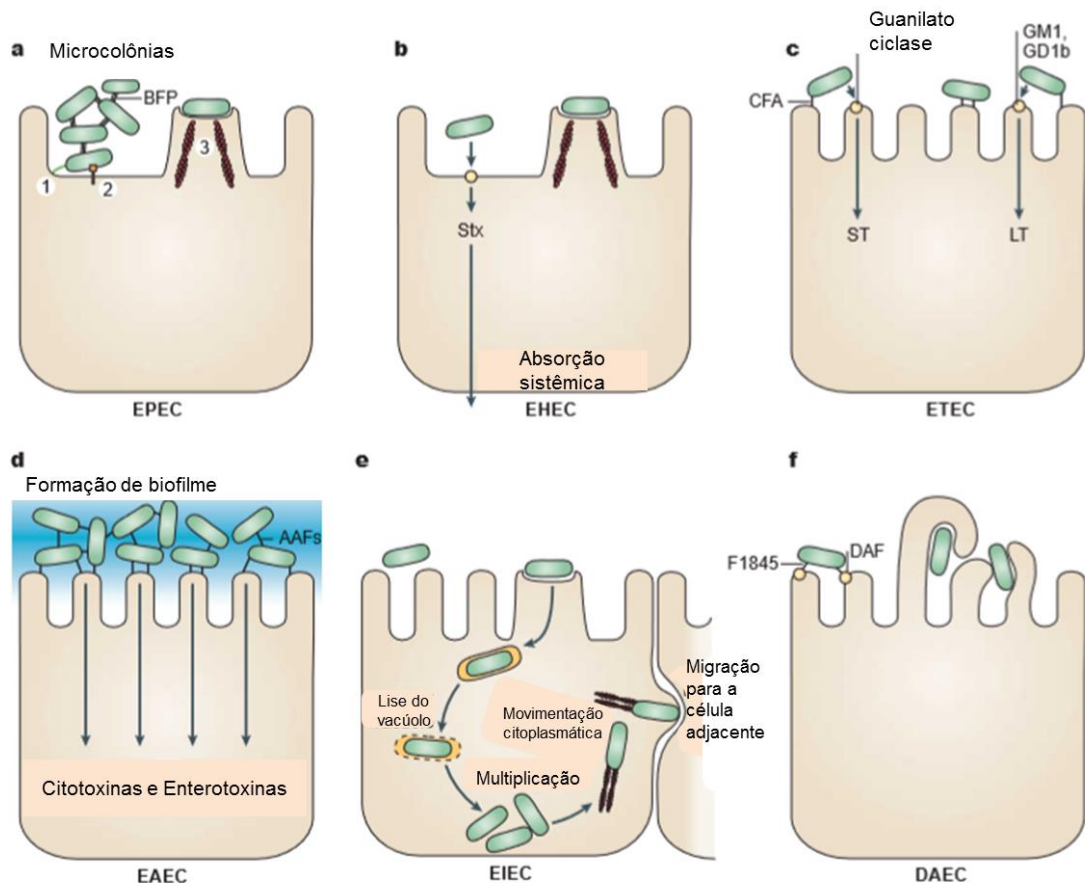
Diante do exposto, deve-se ainda elucidar aspectos relacionados tanto à diversidade de EAEC quanto à sua patogenicidade, incluindo o impacto de comunidades semi-isoladas em sua heterogeneidade, a ocorrência de *Sequence Types* (STs) de EAEC no Brasil, diferenças de virulência entre tEAEC e aEAEC e relação entre fatores genotípicos e fenotípicos e virulência *in vivo*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Escherichia coli*

*E. coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (NATARO, KAPER, 1998). Faz parte da microbiota comensal do trato gastrointestinal de mamífero, coloniza a camada mucosa do cólon e normalmente não causa infecção, exceto em indivíduos imunocomprometidos ou com violação das barreiras intestinais. Entretanto, evolutivamente, algumas cepas adquiriram atributos de virulência codificados em elementos genéticos móveis, gerando os patótipos de *E. coli*, que lhes permitiram se adaptar a novos nichos e causar doenças em indivíduos saudáveis (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). As síndromes clínicas resultantes podem incluir: (i) gastroenterite, disenteria e síndrome hemolítico-urêmica, causadas pelos patótipos DEC; (ii) infecção do trato urinário, causada por *E. coli* uropatogênica (UPEC); (iii) sepse e meningite, causadas por *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC) (KAPER, 2005).

Conforme as características fenotípicas, de virulência e manifestações clínicas, os seguintes patótipos DEC foram descritos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (HARRINGTON, DUDLEY, NATARO, 2005) (Figura 1). Por ser o objeto do nosso estudo, a EAEC será abordada a seguir.



**Figura 1** - Esquema da patogênese dos seis patótipos DEC. a) EPEC - aderência aos enterócitos no intestino delgado, com destruição das microvilosidades e formação da lesão *attaching and effacing* (A/E). b) EHEC - formação da lesão A/E e produção da toxina de Shiga (Stx), associada à Síndrome hemolítico-urêmica. c) ETEC - aderência aos enterócitos no intestino delgado e produção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). d) EAEC - aderência ao epitélio intestinal, formação de biofilme e produção de enterotoxinas. e) EIEC - invasão de células epiteliais, lise do fagolisossomo, movimentação pela célula através da polimerização de filamentos de actina e invasão de células adjacentes. f) DAEC - indução de projeções celulares longas que envolvem a bactéria aderida. (Adaptado de KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

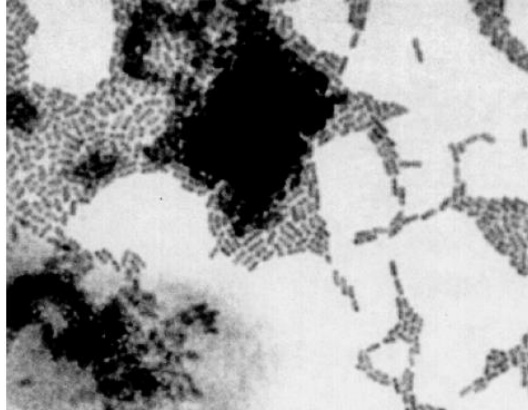
## 2.2 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

### 2.2.1 Caracterização

EAEC foi descrita pela primeira vez em 1987 por Nataro e colaboradores em um estudo para avaliar diferentes padrões de aderência em cultura de células HEp-2 de amostras de *E. coli* coletadas de crianças chilenas com e sem diarreia. Neste estudo foi observado o padrão de aderência na forma de “tijolo empilhado” tanto na superfície das células quanto na lamínula livre de células, que foi denominado



“aderência agregativa” (AA) (NATARO et al., 1987) (Figura 2). Os genes responsáveis pelo fenótipo AA estão codificados em plasmídios de 55-65 MDa, chamados coletivamente de pAA (*plasmid Aggregative Adherence*) (VIAL et al., 1988).

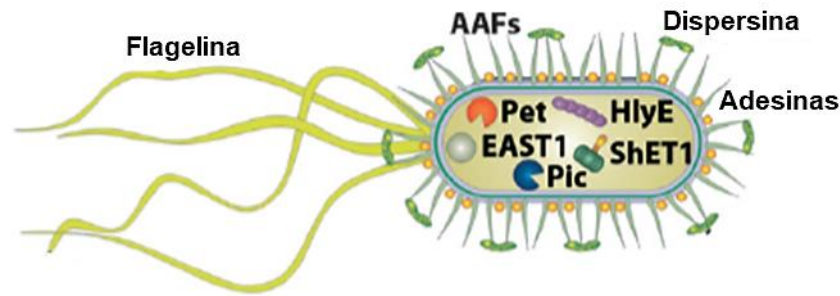


**Figura 2** - Padrão de aderência agregativa em células HEp-2, na forma de “tijolo empilhado” (NATARO, 2004).

EAEC pode ser classificada como típica (tEAEC) e atípica (aEAEC) com base na presença ou ausência do regulon *AggR*, respectivamente, que regula uma série de genes de virulência, como fímbrias de aderência agregativa (AAF) e a proteína de superfície dispersina. Estudos sugerem que as amostras de tEAEC sejam mais virulentas e, portanto, mais propensas a causar diarreia do que as aEAEC (SARANTUYA et al., 2004; MORIN et al., 2013). No entanto, aEAEC também foi relatada como patógeno entérico de surtos de origem alimentar (COBELJIĆ et al., 1996; ITOH et al., 1997).

### **2.2.2 Fatores de virulência, patogênese e manifestações clínicas**

Apesar de ainda não se ter conhecimento sobre quais fatores são realmente essenciais para a patogênese de EAEC, vários fatores de virulência codificados em plasmídios ou cromossomos como adesinas, toxinas e sideróforos têm sido descritos (Figura 3) (Tabela 1), porém a prevalência desses fatores é muito variável e nenhum destes foi detectado apenas em amostras isoladas de pacientes sintomáticos (CZECZULIN et al., 1999; OKEKE et al., 2000; MENDEZ-ARANCIBIA et al., 2008.).



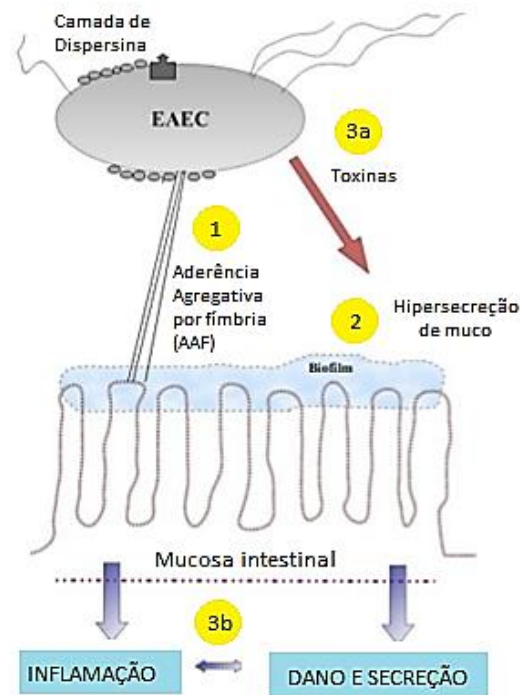
**Figura 3** - Fatores de virulência de EAEC (Adaptado de ESTRADA-GARCIA, NAVARRO-GARCIA, 2012). AAF: Fímbria de aderência agregativa; Pet: Toxina codificada por plasmídeo; HlyE: Hemolisina E; EAST1: Enterotoxina termoestável de EAEC; ShET 1: Enterotoxina de *Shigella* 1; Pic: Proteína envolvida na colonização intestinal.

**Tabela 1** - Principais fatores de virulência de EAEC

Proteína (gene)	Classificação/Função	Localização	Referências
AggR ( <i>aggR</i> )	Regulador transcricional	Plasmídeo	Nataro et al., 1994
Fímbria de aderência agregativa I ( <i>aggA</i> )	Adesina / Aderência agregativa	Plasmídeo	Nataro et al., 1992
Fímbria de aderência agregativa II ( <i>aafA</i> )	Adesina / Aderência agregativa	Plasmídeo	Czczulin et al., 1997
Fímbria de aderência agregativa III ( <i>agg3A</i> )	Adesina / Aderência agregativa	Plasmídeo	Bernier et al., 2002
Fímbria de aderência agregativa IV ( <i>hdaA</i> )	Adesina / Aderência agregativa	Plasmídeo	Boisen et al., 2008
Dispersina ( <i>aap</i> )	Proteína de membrana externa / Dispersão da EAEC na mucosa intestinal	Plasmídeo	Sheikh et al., 2002
Shf ( <i>shf</i> )	Relacionada à formação de biofilme	Plasmídeo / Cromossomo	Czczulin et al., 1999
Enterotoxina termoestável de EAEC (EAST1) ( <i>astA</i> )	Toxina / Alteração no transporte de íons	Plasmídeo	Savarino et al., 1991
Toxina codificada por plasmídeo (Pet) ( <i>pet</i> )	Toxina / Degradação de espectrina	Plasmídeo	Navarro-Garcia et al., 1999
Enterotoxina de <i>Shigella</i> 1 (ShET1) ( <i>set1A</i> )	Toxina / Acúmulo de líquido	Cromossomo	Fasano et al., 1995

Hemolisina $\alpha$ ( <i>hlyA</i> )	Toxina / Formação de poros na membrana celular	Ilha de patogenicidade	Guignot et al., 2000
Enterotoxina de <i>Shigella</i> 2 (ShET2) ( <i>sen</i> )	Toxina / Diarreia aquosa	Plasmídio	Nataro et al., 1995
Toxina autotransportada (Sat) ( <i>sat</i> )	Toxina / Atividade citopática e proteolítica	Ilha de patogenicidade	Guyer et al., 2000
Irp2 (biossíntese de yersiniabactina) ( <i>irp2</i> )	Sideróforo / Quelante de íons férricos	Cromossomo	Czczulin et al., 1999
IucA (sintetase envolvida na síntese de aerobactina) ( <i>iucA</i> )	Sideróforo / Quelante de íons férricos	Plasmídio / Cromossomo	Lorenzo; Neilands, 1986
Chu ( <i>chuA</i> )	Receptor de heme na membrana externa	Cromossomo	Torres; Payne, 1997
Antígeno 43 ( <i>agn43</i> )	Proteína de membrana externa / Agregação bacteriana e formação de biofilme	Cromossomo	Kjaergaard et al., 2000

A patogênese da infecção por EAEC ainda não é totalmente compreendida, visto a grande heterogeneidade do patotipo, apesar disso, têm sido proposto um modelo de patogênese representado em três etapas principais: (i) adesão inicial à superfície da mucosa, (ii) formação de biofilme, e (iii) liberação de toxinas e indução de resposta inflamatória (HARRINGTON, DUDLEY, NATARO, 2005; JENSEN et al., 2014) (Figura 4).



**Figura 4** - Estágios da patogênese de EAEC. (1) Aderência ao epitélio intestinal facilitada por fímbrias (2) Hipersecreção de muco (3a) Secreção de toxinas (3b) Indução de resposta inflamatória (Adaptado de <http://pt.slideshare.net/Wishofnight13/master-thesis-presentation-11402753>).

A transmissão de EAEC ocorre pela via fecal-oral, através de ingestão de água e alimentos contaminados, atingindo assim o intestino, onde poderá iniciar o processo infeccioso (OKEKE, NATARO, 2001; HUANG et al., 2006).

O primeiro passo para a colonização do intestino por EAEC é a adesão ao epitélio intestinal. Essa adesão é mediada, principalmente, por adesinas fimbriais ou afimbriais e são responsáveis pelo padrão AA em células HEp-2. As adesinas fimbriais primeiro caracterizadas foram as fímbrias de aderência agregativa - AAF I, II e III (NATARO et al., 1992; CZECZULIN et al., 1997; BERNIER et al., 2002). Estas fímbrias são codificadas em plasmídios pAA e são responsáveis pelo padrão AA nas cepas referência EAEC 042 e 17-2 (NATARO et al., 1992; ELIAS et al., 1999). Posteriormente foram descritas outras duas variantes da família AAF: AAF IV (Hda), também codificada por plasmídio pAA e presente em amostras que não produzem as AAF I, II e III (BOISEN et al., 2008), e AAF V, que foi mais prevalente que as AAF II e III em estudo realizado na Dinamarca (JØNSSON et al., 2015). Apesar de serem bem caracterizadas, essas adesinas estão presentes em uma baixa porcentagem das amostras de EAEC estudadas, indicando que outras estruturas ainda

desconhecidas são responsáveis pelo padrão AA nestes isolados (ESTRADA-GARCIA, NAVARRO-GARCIA, 2012).

A proteína dispersina, codificada pelo gene *aap* que está presente no plasmídeo pAA2 (SHEIKH et al., 2002), favorece a dispersão de EAEC pela superfície intestinal. Essa proteína é secretada pela bactéria e se liga de maneira não covalente ao LPS, neutralizando sua carga negativa, permitindo que as fímbrias que possuem carga positiva, se tornem livres para se ligar a componentes da matriz extracelular das células epiteliais intestinais (HUANG et al., 2006) como laminina, colágeno tipo IV e fibronectina (IZQUIERDO et al., 2014).

O regulador transcricional AggR foi descrito pela primeira vez em 1994 por Nataro e colaboradores, onde se demonstrou a importância deste regulador na expressão de vários fatores de virulência codificados por plasmídios e envolvidos na sua patogênese, como AFF, dispersina e o sistema de secreção tipo VI (NATARO et al., 1994; DUDLEY et al., 2006). Além de seu papel na regulação de genes plasmidiais, AggR também é responsável pela regulação de ilhas de patogenicidade presentes no cromossomo de EAEC (DUDLEY et al., 2006).

Após a colonização do intestino pela EAEC, ocorre uma secreção excessiva de muco por estímulo de células caliciformes, e formação de biofilme bacteriano (NAVARRO-GARCIA et al., 2010; JENSEN et al., 2014). Esta etapa da patogênese justifica o fato de que EAEC pode provocar diarreia persistente com fezes mucoides em crianças (HUANG et al., 2006), visto que a formação de biofilme permite que as bactérias escapem do sistema imunológico local e se tornem menos acessíveis à ação de antimicrobianos (VAN HOUDT et al., 2004).

A terceira etapa da patogênese de EAEC consiste na liberação de várias toxinas e desencadeamento de uma resposta inflamatória. Exemplos de toxinas envolvidas na patogênese são: (i) *plasmid encoded toxin* (Pet), que cliva espectrina do citoesqueleto, resultado em deformação e exfoliação das células intestinais (NAVARRO-GARCIA et al., 1999); (ii) *protein involved in intestinal colonization* (Pic) que possui atividade de mucinase, degradando a camada mucosa que protege as células, permitindo assim o contato da bactéria com a célula intestinal (HENDERSON et al., 1999); (iii) EAEC *heat-stable enterotoxin* (EAST1), semelhante

à toxina ST de ETEC, causa aumento da secreção de íons cloreto levando à diarreia secretória (MÉNARD; DUBREUIL, 2002).

As enzimas podem também desempenhar papel importante na patogênese de EAEC, principalmente as proteases, visto que seu efeito citotóxico envolve a secreção das proteínas autotransportadoras SPATEs (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014), incluindo Pet e Pic. Além das proteases, outra enzima presente em alguns isolados de EAEC é a hemolisina que provoca citotoxicidade pela formação de poros na membrana da célula hospedeira (GUIGNOT et al., 2000).

As manifestações clínicas e sinais da infecção por EAEC incluem diarreia aguda e persistente, fezes mucoides, dor abdominal, náuseas, vômitos, e, ocasionalmente, febre (CROXEN et al., 2013). Porém, muitos estudos não foram capazes de estabelecer a importância de EAEC como causa de doença, visto que esse patotipo é isolado de indivíduos com diarreia, assim como de indivíduos saudáveis em proporções semelhantes (SCALETSKY et al., 2002; REGUA-MANGIA et al., 2004; BUERIS et al., 2007; SPANO et al., 2008), evidenciando a necessidade de se compreender ainda mais sobre a patogênese deste microrganismo.

### **2.2.3 Modelos utilizados para estudos de patogênese de EAEC**

A fim de compreender as interações que ocorrem entre EAEC e o hospedeiro, diversos estudos têm empregado modelos animais como alternativas para elucidar a sua patogênese. Dentre os modelos mamíferos já foi utilizado o modelo suíno, com o qual se pôde observar os efeitos prejudiciais de EAEC na mucosa do cólon, com desenvolvimento de doença muito semelhante à observada em humanos (TZIPORI et al., 1992). Apesar de ser um modelo ideal para o estudo de doenças do trato gastrointestinal humano, este modelo não permite o trabalho em larga escala, além de ser mais laborioso que o uso de roedores (PHILIPSON; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2013). O modelo de roedores é o mais utilizado atualmente para EAEC como para vários outros microrganismos (MORIN et al., 2010; ROCHE et al., 2010), porém, por questões éticas e de menores custos de criação, têm-se empregado, nos últimos anos, modelos invertebrados como o nematóide *Caenorhabditis elegans* (FRANÇA et al., 2013) e as larvas de *Galleria mellonella*

(JØNSSON et al., 2016; KHALIL et al., 2016). Como larvas de *G. mellonella* foram utilizadas em nosso estudo, este modelo será descrito a seguir.

### 2.3 *Galleria mellonella*

*Galleria mellonella* é um inseto, também conhecido como traça da cera, pertencente à ordem *Lepidoptera* e à família *Pyralidae*. Suas larvas têm sido utilizadas como modelo de infecção para diversos microrganismos, incluindo fungos e bactérias, como: *Candida albicans* (BRENNAN et al., 2002; MOWLDS, KAVANAGH, 2008), *Aspergillus fumigatus* (REEVES et al., 2004), *Cryptococcus neoformans* (MYLONAKIS et al., 2005), *Enterococcus* spp (GASPAR et al., 2009; MARTINI et al., 2015), *Staphylococcus aureus* (DESBOIS; COOTE, 2011) *Listeria monocytogenes* (JOYCE; GAHAN, 2010), *Pseudomonas aeruginosa* (JANDER, RAHME, AUSUBEL, 2000; ANDREJKO, MIZERSKA-DUDKA, 2011), *Klebsiella pneumoniae* (INSUA et al., 2013), *Acinetobacter baumannii* (PELEG et al., 2009), *E. coli* (LEUKO, RAIVIO, 2012; MORGAN, ORTIZ, RIORDAN, 2014; CIESIELCZUK et al., 2015; JØNSSON et al., 2016), dentre outros. Além de ser utilizado como modelo para avaliar virulência, as larvas de *G. mellonella* também têm sido empregadas para análise de eficácia de antimicrobianos *in vivo*, servindo como um modelo alternativo para o *screening* de novos fármacos ou para combinações de drogas já existentes (DESBOIS, COOTE, 2011; THOMAS et al., 2013; BETTS et al., 2014).

O modelo de *G. mellonella* apresenta vantagens em relação aos modelos mamíferos e outros modelos invertebrados como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. As principais vantagens são: (i) baixos custos de criação, pois não necessitam de equipamentos laboratoriais especiais (TSAI, LOH, PROFT, 2016); (ii) possuem um tamanho relativamente grande (aproximadamente 2 cm e 250 mg), o que facilita a manipulação e permite a injeção de doses precisas de bactéria (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012); (iii) não há restrições éticas como os modelos de mamíferos (TSAI, LOH, PROFT, 2016); (iv) seu sistema imunológico apresenta uma elevada similaridade, tanto estrutural como funcional, com o sistema imunológico inato de vertebrados, sendo hemócitos as células análogas aos neutrófilos humanos, responsáveis pela fagocitose dos microrganismos (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013); (v) sobrevivência a 37°C,

o que permite a investigação de fatores de virulência dependentes da temperatura, diferentemente dos outros modelos invertebrados (TSAI, LOH, PROFT, 2016).

Além da resposta imunológica celular, mediada pelos hemócitos, *G. mellonella* também apresenta uma resposta imunológica humoral constituída por moléculas efetoras, incluindo opsoninas (PARK et al., 2005; SHAIK, SEHNAL 2009), peptídeos antimicrobianos (LEE et al., 2004; BROWN et al., 2009) e melanina (SODERHALL; CERENIUS, 1998). O processo de melanização, que tem por objetivo encapsular o patógeno, ocorre pelo desencadeamento de uma cascata de serino proteases que culmina com a conversão da pro-fenoloxidase, produzida pelos hemócitos, em fenoloxidase. Essa enzima oxida substâncias fenólicas a quinonas, que se polimerizam e formam a melanina que, por sua vez, se deposita em volta do microrganismo; além disso, produz espécies reativas de oxigênio que são tóxicas para o patógeno (TSAI, LOH, PROFT, 2016).

Alguns estudos vêm utilizando este modelo para avaliação de virulência de patótipos de *E. coli*, tanto extra-intestinais (ExPEC) quanto patótipos de DEC, incluindo dois estudos recentes com EAEC (LEUKO; RAVIO, 2012; WILLIAMSON et al., 2014; JØNSSON et al., 2016; KHALIL et al., 2016).

O primeiro estudo foi publicado em 2012 por Leuko e Raivio que avaliaram o uso de *G. mellonella* para estudo de virulência de EPEC. Observaram que EPEC é capaz de matar as larvas, mas cepas mutantes para fatores de virulência como o sistema de secreção tipo três e *bundle forming pilus* (BFP) não apresentaram o mesmo resultado que as cepas selvagens, indicando a importância destes fatores para a patogênese de EPEC. Por sua vez, Morgan e colaboradores (2014) analisaram a virulência de cepas selvagens e mutantes de EHEC, demonstrando o importante papel da proteína TolA na sua patogênese. Estudo com ExPEC demonstrou correlação entre número de genes de virulência e sobrevivência das larvas, ou seja, isolados de ExPEC com mais genes de virulência matavam as larvas mais rapidamente que os isolados com menor quantidade de genes, validando o modelo para estudos posteriores com este patótipo (WILLIAMSON et al., 2014).

Em relação aos dois únicos estudos publicados com EAEC, tanto Khalil et al. (2016) quanto Jønsson et al. (2016) investigaram apenas tEAEC, analisando ou a virulência de isolados clínicos ou padronizando o modelo de *G. mellonella* para estudos da



patogenicidade, respectivamente. Nenhum dos estudos investigou aEAEC, restando ainda a ser elucidado, por exemplo, se existiria diferença de patogenicidade entre as tEAEC e aEAEC e entre isolados com diferentes repertórios de virulência em modelo de *G. mellonella*.

#### **2.4 Análise de diversidade bacteriana**

Metodologias de tipagem molecular, como padrão de fragmentação do DNA cromossômico e separação em gel por eletroforese de campo pulsado (PFGE) e *multilocus sequence typing* (MLST), têm sido amplamente empregadas para análise de diversidade bacteriana.

A metodologia de PFGE, que se baseia no corte do DNA genômico total por enzimas de restrição em 15-35 fragmentos e separação destes em eletroforese com campos elétricos alternados, é a técnica considerada padrão-ouro e, portanto, a mais utilizada para tipagem de diversas bactérias, inclusive em casos de investigação de surtos de origem alimentar (NEMOY et al., 2005; VIMONT et al., 2008; HYYTIA-TREES et al., 2007; DURMAZ et al., 2009). Essa metodologia possui um alto poder discriminatório entre as cepas, porém depende de um procedimento laborioso e requer uma padronização rigorosa de protocolos para que seja possível uma comparação inter-laboratorial, sendo pouco aplicável para comparações a nível global e por longos períodos de tempo (HYYTIA-TREES et al., 2007). Portanto, a técnica de PFGE é mais apropriada para estudos de epidemiologia local em um curto período de tempo. Estudos analisando isolados de EAEC pela técnica de PFGE demonstraram alta diversidade clonal entre os isolados de diferentes regiões geográficas, incluindo um estudo realizado no Rio de Janeiro (ADACHI et al., 2001; KAHALI et al., 2004; REGUA-MANGIA et al., 2009).

Por outro lado, a técnica de MLST, que se baseia no sequenciamento de cinco a dez genes constitutivos, sobrepõe as dificuldades descritas para o PFGE, visto que sequências de nucleotídeos podem ser prontamente comparadas com outros laboratórios via MLST website (MAIDEN et al., 1998). Além disso, como os genes constitutivos sofrem pouca pressão seletiva, as mudanças ocorrem de maneira mais lenta, tornando essa ferramenta aplicável para estudos de evolução de

microrganismos (HYTTIA-TREES et al., 2007). Desta forma, o MLST pode ser aplicado para investigações epidemiológicas em longo prazo e de amostras não relacionadas geograficamente, além de fornecer aspectos evolutivos das linhagens bacterianas, podendo ser utilizada complementarmente à técnica de PFGE. Neste sentido, já foram descritos 197 STs de EAEC no banco de dados, mas a maioria dos dados disponíveis refere-se a isolados da Europa, Ásia e África e somente um registro de ST de EAEC no Brasil (ST164) ([http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains)). Estudos epidemiológicos analisaram a diversidade de EAEC pela técnica de MLST em amostras provenientes da Nigéria (OKEKE et al., 2010) e de Bangladesh (CHATTAWAY et al., 2017), demonstrando a sua grande heterogeneidade. Até o momento, de nosso conhecimento, somente um estudo utilizou essa técnica em isolados de EAEC do Brasil o qual analisou amostras de EAEC com potencial extra-intestinal e observou o ST10 como o mais prevalente (NUNES et al., 2017).

Além dessas metodologias, procedimentos relativamente mais simples como a detecção do repertório de genes de virulência e do perfil de plasmídios também são utilizadas para a análise de diversidade bacteriana. A PCR, empregada para detecção de genes de virulência, é uma metodologia reconhecida para caracterização de populações bacterianas, e, quando utilizados protocolos bem estabelecidos, proporciona resultados reprodutíveis, sensíveis e específicos (REGUA-MANGIA et al., 2009). A comparação de perfis de plasmídios também é capaz avaliar a possível relação de isolados clínicos de uma espécie bacteriana em estudos epidemiológicos e investigação de surtos (DUTTA et al., 2002; FARSHAD et al., 2006). Em se tratando de EAEC, essas metodologias são usualmente aplicadas, considerando a grande heterogeneidade de repertórios de genes de virulência dos isolados e que grande parte dos genes de virulência é codificada por plasmídios (VIAL et al., 1988; HUANG et al., 2007; TOKUDA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013).

### 3 JUSTIFICATIVA

EAEC tem se destacado como patógeno entérico emergente, causando diarreia tanto em adultos como em crianças em diversas regiões do mundo, principalmente em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (SPANNO et al., 2008; MORENO et al., 2010; LOZER et al., 2013; SPANNO et al., 2017). Esse patotipo tem como característica marcante sua heterogeneidade quanto aos potenciais fatores de virulência, com nenhum deles estando uniformemente presente em todos os isolados (OKEKE et al., 2000; SUZART et al., 2001; OKEKE et al., 2010). Entretanto, de nosso conhecimento, não há ainda descrição na literatura se isolados de indivíduos que vivem em áreas geográficas semi-isoladas refletiriam no mesmo grau de heterogeneidade.

As comunidades quilombolas no norte do Espírito Santo são caracteristicamente rurais e semi-isoladas, o que restringe a transmissão de amostras bacterianas entre indivíduos de diferentes comunidades. Entretanto, estudo anterior de nosso laboratório que analisou a presença e distribuição plasmidial nas mesmas amostras de aEAEC e tEAEC revelou grande diversidade de plasmídios de baixo peso molecular, especialmente entre aEAEC, sem restrição geográfica entre as comunidades quilombolas (SILVA, 2016). A fim de analisarmos se as áreas geográficas semi-isoladas, cuja população tem restrito o contato com a área urbana, impactam na heterogeneidade ou disseminação de diferentes cepas de EAEC, utilizamos metodologias moleculares como PFGE e MLST para realizar uma análise epidemiológica mais acurada sobre a heterogeneidade e distribuição geográfica destas cepas nestas comunidades. Além disso, pouco se sabe sobre os STs de EAEC que são encontrados na América do Sul, inclusive no Brasil, considerando que a maior parte das cepas registradas até o momento no banco de dados de MLST de *E. coli* referem-se a isolados da Europa, Ásia e África ([http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains)).

Sugere-se na literatura que as tEAEC sejam mais virulentas, por carregarem o regulon AggR que regula uma série de genes de virulência (SARANTUYA et al., 2004; MORIN et al., 2013), porém, nenhum estudo avaliou *in vivo* diferença de virulência entre tEAEC e aEAEC. Considerando que os estudos contemplando as aEAEC são escassos na literatura, que as aEAEC foram mais prevalentes que as

tEAEC nas comunidades quilombolas (MONFARDINI, 2012) e que o modelo de *G. mellonella* apresenta diversas vantagens em relação a outros modelos animais com importante correlação com modelos mamíferos (PELEG et al, 2009), propusemos então analisar com esse modelo se existe diferença na virulência entre isolados de tEAEC e aEAEC, além da possível relação entre o potencial de virulência *in vivo* e os aspectos genotípicos e fenotípicos de virulência das amostras de EAEC.

A patogênese de EAEC ainda não é totalmente compreendida devido à sua grande heterogeneidade. Sabe-se que as enzimas podem desempenhar um importante papel na patogênese de diversos microrganismos (GUIGNOT et al., 2000; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014; RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2016), porém, até o momento não se investigou fenotipicamente a produção de enzimas como fosfolipase e esterase em isolados de EAEC. Sendo assim, investigamos a produção destas e outras enzimas por tEAEC e aEAEC como potencial característica de virulência.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Determinar a relação genética e o potencial de virulência de isolados de *Escherichia coli* enteroagregativa de crianças de comunidades quilombolas.

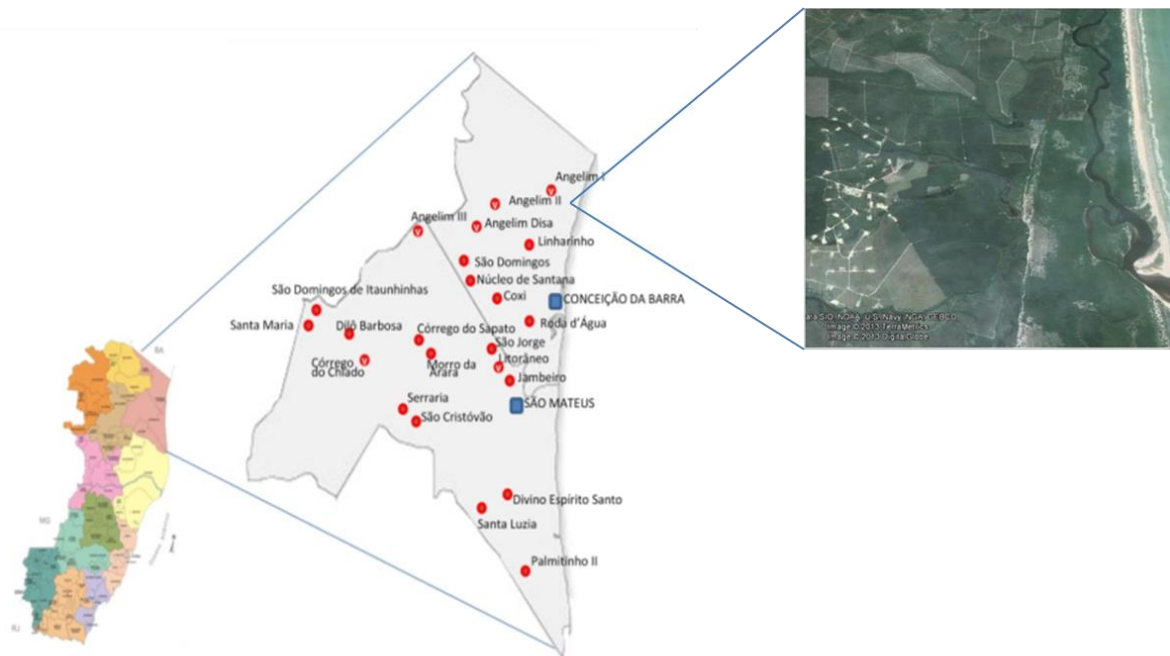
### 4.2 Objetivos Específicos

- i. Verificar relação clonal entre isolados de EAEC de comunidades quilombolas;
- ii. Verificar a distribuição geográfica de pulsotipos de EAEC isolados de diferentes comunidades quilombolas;
- iii. Investigar a sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* inoculadas com cepas referência e isolados de tEAEC e aEAEC, além de cepa de *E. coli* não patogênica;
- iv. Avaliar o crescimento bacteriano na larva durante a infecção por cepas referência de tEAEC, aEAEC e *E. coli* não patogênica.
- v. Relacionar potencial de virulência *in vivo* com genes e aspectos fenotípicos de virulência;
- vi. Evidenciar o *sequence type* de isolados de tEAEC e aEAEC e relacionar com STs mundialmente descritos.

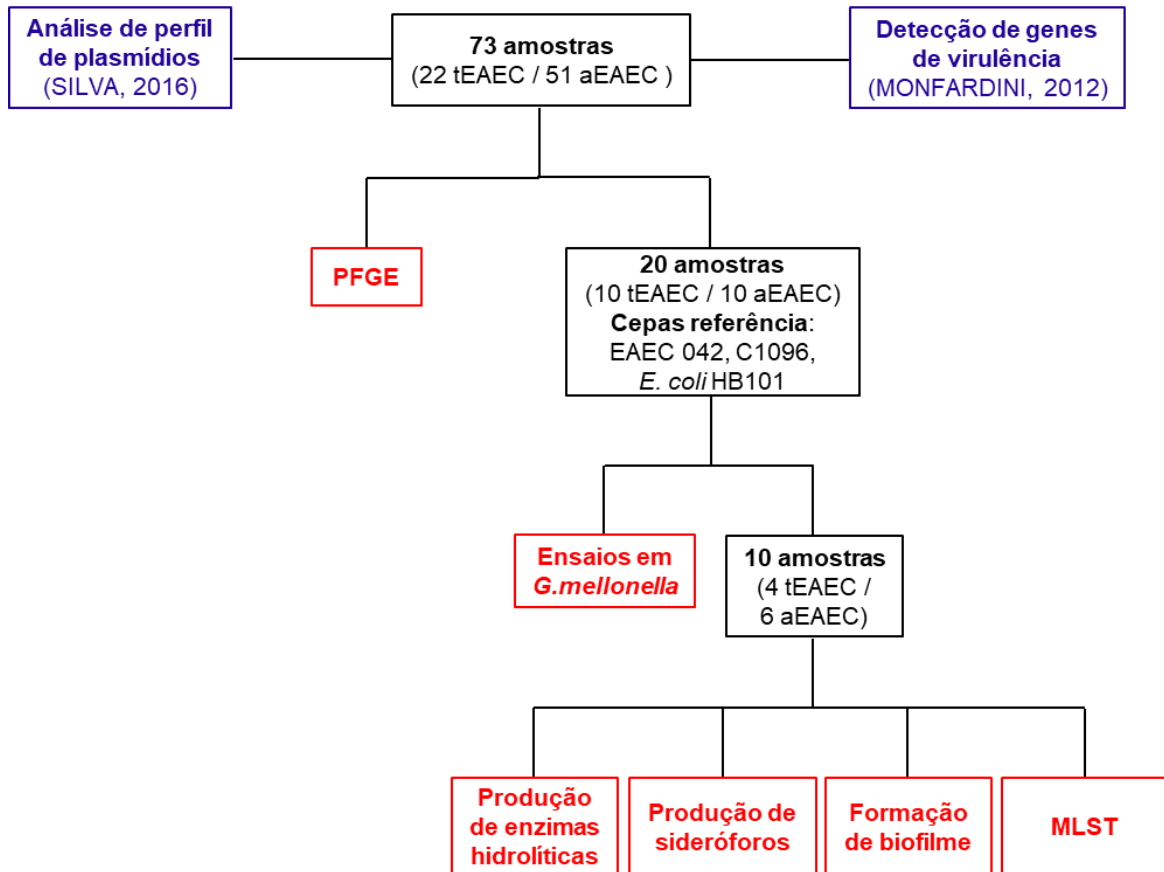
## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Caracterização das amostras bacterianas

Foram analisadas 73 amostras de EAEC (22 tEAEC e 51 aEAEC) isoladas de fezes de crianças, com e sem diarreia, de até 11 anos de idade que vivem em 22 comunidades quilombolas no norte do Espírito Santo, sendo de 1 a 12 amostras por comunidade (Figura 5). Estas amostras foram previamente caracterizadas quanto à presença de genes de virulência relacionados com aderência bacteriana, produção de toxinas, captação de ferro e produção de biofilme (MONFARDINI, 2012) (Anexo 1). As tEAEC apresentam repertório de genes variando de cinco a dez por amostra, e as aEAEC, de zero a cinco por amostra (Anexo 1). Todas as amostras se encontram armazenadas na bacterioteca do LabViG (Laboratório de Gastroenterite Infeciosa e Virologia – UFES) em solução de sacarose 24% (p/v) em freezer -20°C. Nos ensaios de virulência, também foram analisadas as cepas referência EAEC 042 (tEAEC) e C1096 (aEAEC), além da cepa de *E. coli* não patogênica HB101, que foi utilizada como controle negativo. Os ensaios realizados no presente estudo estão representados na Figura 6.



**Figura 5** - Mapa do Espírito Santo, com destaque para os municípios do norte do estado Conceição da Barra (norte) e São Mateus (sul) com localização estimada (círculos vermelhos) das comunidades Quilombolas do Norte do Espírito Santo de onde foram obtidas as amostras de EAEC; mapa de satélite da comunidade Angelim II (Fonte: Google e Image @2013 Digital Globe), evidenciando a distribuição das moradias (Adaptado de LOZER, 2011).



**Figura 6** – Fluxograma dos ensaios realizados no presente estudo (em vermelho) e em estudos anteriores de nosso laboratório (em azul).

## 5.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão com enzima de restrição

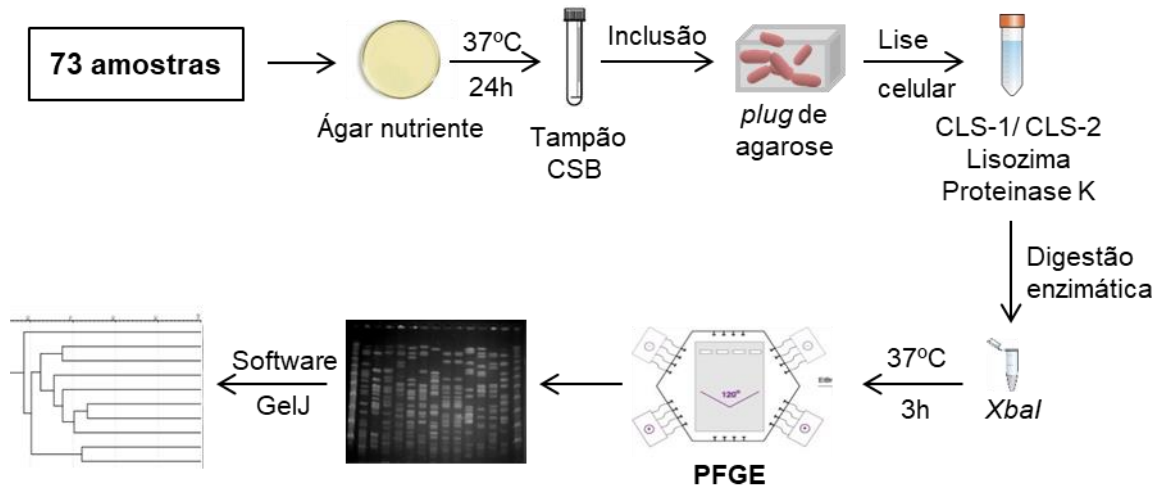
As 73 amostras de EAEC foram semeadas em ágar nutriente (Kasvi – Itália) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, as colônias foram suspensas em 1 mL de tampão CSB (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA) e ajustadas até escala 4 de McFarland ( $12 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, 200 µL desta suspensão bacteriana foram transferidos para microtubo e adicionados 200 µL de agarose *low melting* a 2% (p/v) em CSB (Promega, EUA) e 1% (p/v) de SDS (Sigma-Aldrich). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes para blocos de agarose (*plugs*). Após a solidificação, os *plugs* foram transferidos para tubos contendo 500 µL do tampão de lise CLS-1 (50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 50 mM EDTA), 25 µL Lisozima (50 mg/µL) (Sigma-Aldrich) e 15 µL de Proteinase K (50 mg/µL) (Sigma-Aldrich), e incubados 37°C por 1 hora. Após a incubação, a solução foi removida, foram adicionados 500 µL do tampão de lise CLS-2 (EDTA 0,5 M e Sarcosil 1%), 4 µL de

Proteinase K (50 mg/ $\mu$ L) e os tubos, incubados a 55°C por 2 horas. Em seguida, a solução de lise foi removida e os *plugs* foram lavados três vezes com 2 mL de água ultra pura estéril pré-aquecida (50°C) e três vezes com 2 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH 7,6), com incubações de 15 min a 50°C entre as lavagens. A solução de lavagem foi removida e os *plugs* foram armazenados em 3 mL de tampão TE pH 7,6.

Para a digestão com a enzima de restrição, um terço do *plug* foi cortado e transferido para um microtubo contendo 90  $\mu$ L de água ultrapura estéril e 10  $\mu$ L do tampão da enzima (10X) e incubado a 37°C por 30 min. Em seguida, o tampão foi removido e foram adicionados 90  $\mu$ L de água ultra pura estéril, 10  $\mu$ L do tampão da enzima de restrição 10X, 4  $\mu$ L da enzima *Xba*I (Sigma-Aldrich) (40 U) e o microtubo foi incubado a 37°C por 3 horas.

Após a digestão, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em campo pulsado (CHEF-DR III® – Bio-Rad, EUA) em gel de agarose 1% (p/v) (Bio-Rad, EUA) preparado em TBE 0,5X. Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 5 a 30 segundos, por 20 horas a 6 V/cm, temperatura de 14°C e ângulo de 120°. Foi utilizado como marcador de tamanho molecular Lambda Ladder PFGE Marker (50 - 1.000 kb) (New England Biolabs). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5  $\mu$ g/mL e visualizados em sistema de documentação de géis MiniBIS® Pro (BioAmérica). A análise dos perfis de fragmentação foi realizada através do dendograma gerado pelo *software* "GelJ" (HERAS et al., 2015) (Figura 7). A porcentagem de similaridade foi estimada utilizando o coeficiente de Dice e foram consideradas amostras pertencentes ao mesmo pulsotipo aquelas que apresentaram similaridade  $\geq$ 80%.





**Figura 7** – Fluxograma simplificado da técnica de PFGE. CSB: *Cell suspension buffer*; CLS: *Cell lysis solution*.

### 5.3 Ensaio de virulência em larvas de *Galleria mellonella*

Foram aleatoriamente selecionadas vinte amostras de EAEC, sendo dez tEAEC e dez aEAEC, contendo de seis a dez genes e de nenhum a cinco genes de virulência, respectivamente, cujos repertórios podem ser observados no Quadro 1. Também foram analisadas as cepas referência de tEAEC (EAEC 042), aEAEC (C1096) e de *E. coli* não patogênica (HB101). Todos os testes foram realizados em triplicata biológica.

**Quadro 1** - Perfil de genes de virulência das amostras aleatoriamente selecionadas para o ensaio de virulência (MONFARDINI, 2012).

Grupo	Isolado	Gene (n)	aggR	aggA	aafA	agg3A	hdaA	aap	shf	astA	pet	set1A	hlyA	sen	sat	irp2	iucA	chuA	agn43
tEAEC	Q028B	6	■			■		■				■				■		■	
	Q154A	8	■	■						■	■					■			■
	Q226A	8	■													■	■		■
	Q255D	9	■		■		■									■			■
	Q266B	7	■				■	■				■						■	
	Q269D	7	■				■	■				■						■	
	Q287A	10	■					■					■			■	■		■
	Q320A	8	■					■								■	■		■
	Q323A	8	■					■								■	■		■
	Q434A	10	■				■	■								■	■		■
aEAEC	62B	2														■			■
	89A	1								■									
	104A	2									■						■		
	110C	0																	
	133A	1														■			
	155E	0																	
	Q015B	5							■	■	■	■						■	
	Q110A	0																	
	Q185E	5									■					■	■	■	■
	Q437A	4					■				■						■	■	

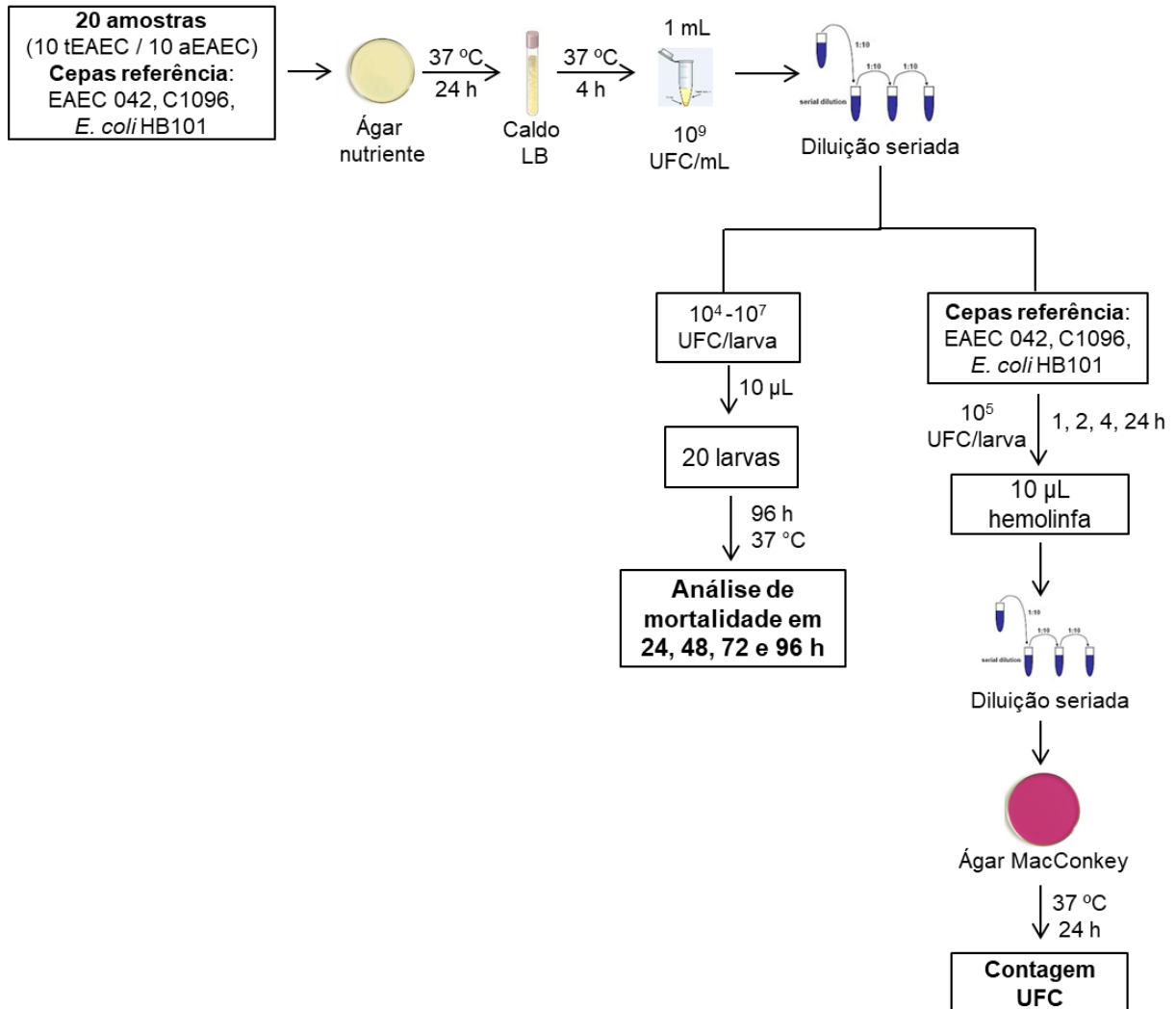
### 5.3.1 Análise de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolados de EAEC

As amostras selecionadas foram semeadas em ágar nutriente e incubadas por 18-24 horas a 37°C. Após o crescimento da bactéria, colônias foram suspensas em caldo Luria Bertani (LB) (Kasvi – Itália) até densidade óptica (DO) de 0,1 em comprimento de onda de 620 nm, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 4 h para que atingissem a fase exponencial de crescimento, tempo previamente determinado por curva de crescimento das amostras. Após a incubação, 1 mL da suspensão bacteriana foi centrifugado, o *pellet* foi ressuspensão em tampão fosfato-salino (PBS) e foram feitas diluições seriadas. Foram testadas concentrações que variaram de  $10^4$  a  $10^7$  UFC/larva. Cada concentração foi testada em 20 larvas e cada larva foi inoculada com 10 µL de suspensão bacteriana na

hemocele utilizando seringas de insulina (Becton Dickinson). As larvas infectadas foram alocadas em placas de Petri, incubadas a 37°C e a mortalidade foi monitorada a cada 24 h por até 96 h após a infecção. Foram consideradas mortas as larvas que não respondiam ao toque. O controle foi constituído por larvas inoculadas com PBS estéril e com cepa de *E. coli* não patogênica HB101 (Figura 8). Foram consideradas amostras de alta virulência as que provocaram menos de 40% de sobrevivência ao final do experimento na concentração  $10^5$  UFC/larva, moderada virulência as que provocaram de 40 a 60% de sobrevivência e baixa virulência mais de 60% de sobrevivência.

### **5.3.2 Determinação da carga bacteriana na hemolinfa após a infecção**

As cepas referência de EAEC (EAEC 042 e C1096) e a cepa não patogênica HB101 foram inoculadas na hemocele na concentração de  $10^5$  UFC/larva. A concentração de bactéria na hemolinfa foi monitorada em 0 h, 2 h, 4 h, 6 h e 24 h após a infecção. Foram utilizadas como controle negativo larvas inoculadas com PBS estéril. Em cada tempo foi feita a antissepsia da superfície das larvas com etanol 70% (v/v), seguido de um corte no último pseudo-pé com remoção de dez microlitros de hemolinfa, que foram transferidos para microtubos estéreis, diluídos seriadamente, semeados em ágar MacConkey (Oxoid – Reino Unido) e incubadas a 37°C por 24 h. Esse procedimento foi realizado para três larvas individualmente em cada tempo. Para o cálculo da concentração bacteriana em UFC, foi considerada a média das larvas testadas (Figura 8).



**Figura 8** – Fluxograma dos ensaios de virulência em larvas de *Galleria mellonella*. À esquerda representa a análise de sobrevivência e à direita, a determinação da carga bacteriana na hemolinfa. LB: Luria Bertani, UFC: Unidade Formadora de Colônia.

#### 5.4 Caracterização fenotípica de fatores de virulência

A caracterização fenotípica de fatores de virulência foi realizada para dez amostras que foram utilizadas no teste de virulência em *G. mellonella*, por meio do ensaio de produção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase, protease, esterase e hemolisina) e de sideróforo, conforme descrito por Searle et al. (2015), com modificações, e da produção de biofilme, conforme descrito por Sheikh et al (2001), brevemente apresentados a seguir.

#### 5.4.1 Ensaio de produção de enzimas hidrolíticas e de sideróforo

Para ambos os ensaios foram utilizados 200 µL de suspensão bacteriana na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, conforme previamente descrito, adicionados a 2 mL de caldo LB e incubados a 37°C por 24 h. Em seguida, 5 µL da suspensão foram inoculados no centro de placas de Petri com (i) os meios de cultura contendo o substrato da enzima hidrolítica a ser testada (Anexo 2) e (ii) ágar chrome azurol S (CAS) para ensaio de produção de sideróforo (LOUDEN, HAARMANN, LYNNE, 2011), seguido por incubação a 37°C por 48 h.

A atividade enzimática, observada pela formação de um halo de degradação ao redor da colônia bacteriana, e a produção de sideróforos, observada pela formação de um halo alaranjado ao redor da colônia, foram quantificados pelo índice Pz, determinado pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo (PRICE, WILKINSON, GENTRY, 1982).

O índice Pz foi classificado em quatro categorias conforme Price, Wilkinson, Gentry (1982) (Quadro 2).

**Quadro 2** - Classificação do índice Pz (PRICE, WILKINSON, GENTRY, 1982).

Índice Pz	Interpretação
1,000	Negativo
0,999 – 0,700	Fraco produtor
0,699 – 0,400	Bom produtor
0,399 – 0,100	Excelente produtor

#### 5.4.2 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica

Além das dez amostras utilizadas no teste de virulência em *G. mellonella*, o ensaio de formação de biofilme foi realizado também para a cepa referência EAEC 042 e para a *E. coli* HB101, utilizada como controle negativo, conforme descrito por Sheikh et al. (2001), com modificações. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

Uma colônia de cada amostra ou cepa referência obtida em ágar nutriente foi suspensa em 2 mL de caldo LB e incubada a 37°C por 18 h com agitação a 110 rpm.

Em seguida, a suspensão foi ajustada para concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, conforme previamente descrito, e 2  $\mu$ L da suspensão foram adicionados a 200  $\mu$ L de meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab – Brasil) suplementado com 0,4% (p/v) de glicose em poços de microplaca de poliestireno de 96 poços. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h para a formação do biofilme e as células não aderidas foram removidas por meio de três lavagens com PBS.

O biofilme foi fixado com 100  $\mu$ L de metanol por 15 min e a microplaca foi seca à temperatura ambiente. Para a coloração, foram adicionados 100  $\mu$ L de solução de cristal violeta 0,3% por 20 min e a microplaca lavada com água destilada. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L de ácido acético 33% por 5 min e 100  $\mu$ L foram transferidos para uma nova microplaca para medida da DO.

A classificação da amostra bacteriana em “formadora” e “não formadora” de biofilme foi realizada considerando-se a média ( $\bar{x}$ ) e o desvio padrão (DP) do controle negativo testado. Amostras bacterianas apresentando DO superior à média mais três vezes o DP do controle negativo foram consideradas “formadoras” de biofilme (STEPANOVIC et al., 2007).

## **5.5 Multilocus Sequence Typing (MLST)**

Os dez isolados de EAEC analisados nos testes fenotípicos de virulência foram submetidos à técnica de MLST. Esta técnica se baseia na análise das sequências de sete genes conservados para determinação de seu “*sequence typing*” (ST) e posterior comparação com banco de dados internacional. O procedimento foi realizado conforme estabelecido por Wirth et al.(2006) com modificações e descrito a seguir.

### **5.5.1 Amplificação dos genes por PCR**

Duas colônias de cada amostra analisada foram suspensas em 100  $\mu$ L de água deionizada (Milli-Q® / Millipore), submetidas à lise térmica a 100°C por 5 min, seguido por centrifugação a 10.000 x g por 1 min. O sobrenadante contendo DNA bacteriano foi mantido congelado à -20°C em alíquotas de 20  $\mu$ L e descongeladas no momento do uso.

A reação de amplificação foi realizada com 5 µL do DNA extraído adicionados a 20 µL da mistura de reação para PCR, conforme concentrações descritas no Quadro 3.

**Quadro 3** - Mistura de reagentes para PCR para detecção dos genes analisados na técnica de MLST.

Reagentes	Concentração
H <sub>2</sub> O	qsp 25 µL
Tampão de reação (10X)	1 X
dNTP (2,5 mM)	200 µM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5 mM
Iniciador (F)	0,4 µM
Iniciador (R)	0,4 µM
Taq polimerase (5U/µL)	0,02 U/µL
DNA	10 ng/µL

F: *Forward*; R: *Reverse*.

Os iniciadores e as condições de amplificação para os sete genes utilizados na técnica de MLST estão descritos no site [http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi\\_html](http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi_html) e apresentados no Quadro 4. Todas as reações de amplificação foram realizadas no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®). Após a amplificação, os produtos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em TBE 0,5X, corados com brometo de etídio (EtBr) 0,5 µg/mL e visualizados sob luz ultravioleta em sistema de documentação de géis MiniBIS® Pro (BioAmérica).

**Quadro 4** - Iniciadores e condições de amplificação dos genes analisados na técnica de MLST.

Gene	Descrição	Direção	Sequência (5' - 3')	Fragmento (pb)	Condições de amplificação
<i>adk</i>	Adenilato cinase	F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	95°C/2min, 30x (95°C/1min; 54°C/1min; 72°C/2min), 72°C/5min
		R	CCGTCAACTTTTCGCGTATTT		
<i>fumC</i>	Fumarato hidratase	F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	95°C/2min, 30x(95°C/1min; 54°C/1min; 72°C/2min), 72°C/5min
		R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>gyrB</i>	DNA girase	F	TCGGCGACACGGATGACGGC	911	95°C/2min, 30x(95°C/1min; 60°C/1min; 72°C/2min), 72°C/5min
		R	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>icd</i>	Isocitrato/ Isopropilmalato desidrogenase	F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878	95°C/2min, 30x(95°C/1min; 54°C/1min; 72°C/2min), 72°C/5min
		R	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdh</i>	Malato desidrogenase	F	AGCGCGTTCTGTTCAAATGC	932	95°C/2min, 30x(95°C/1min; 60°C/1min; 72°C/2min), 72°C/5min
		R	CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT		
<i>purA</i>	Adenilsuccinato desidrogenase	F	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	95°C/2min, 30x(95°C/1min; 54°C/1min; 72°C/2min), 72°C/5min
		R	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>recA</i>	Sítio de ligação de ATP/GTP	F	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	780	95°C/2min, 30x(95°C/1min; 58°C/1min; 72°C/2min), 72°C/5min
		R	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA		

F: Forward; R: Reverse; pb: pares de base.



### 5.5.2 Purificação do produto de PCR

Os iniciadores e nucleotídeos não incorporados foram eliminados purificando-se 5  $\mu\text{L}$  do produto da PCR com 1  $\mu\text{L}$  da preparação enzimática ExoProStar™ (GE Healthcare), com incubação a 37°C por 15 min e a 80°C por 15 min. O produto purificado foi mantido a -20°C até sua utilização na reação de sequenciamento.

### 5.5.3 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems®), conforme instruções do fabricante e descrito no Quadro 5, seguindo condições de amplificação apresentadas no Quadro 6.

**Quadro 5** - Mistura de reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

Reagentes	Volume
Produto purificado	1,0 $\mu\text{L}$
BigDye Terminator	1,0 $\mu\text{L}$
Tampão 5x	1,5 $\mu\text{L}$
Primer F (3,2 pmol)	1,0 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O Milli-Q (qsp 10 $\mu\text{L}$ )	5,5 $\mu\text{L}$

**Quadro 6** - Condições de amplificação da reação de sequenciamento.

Etapa	Temperatura / Tempo
Desnaturação inicial	96° C / 1 min
<u>35 ciclos</u>	
Desnaturação	95° C / 10 s
Elongação	50° C / 5 s
Extensão	60° C / 4 min
Extensão final	72° C / 10 min
Manutenção	4° C / $\infty$

#### 5.5.4 Purificação da reação de sequenciamento

O produto da reação de sequenciamento foi purificado por meio da precipitação com etanol / EDTA para eliminação de iniciadores e dideoxinucleotídeos não incorporados, conforme descrito a seguir.

Em cada tubo, foram adicionados 5 µL de EDTA (125 mM, pH 8,0) e 60 µL de etanol PA seguido por incubação à temperatura ambiente por 15 min, e centrifugação a 3000 x g por 30 min. Ao sedimento foram adicionados 60 µL de etanol 70% (v/v) e submetidos à centrifugação a 1.650 x g por 15 min. O sedimento foi seco a 60°C por 10 min, eluído em formamida e submetido à eletroforese capilar no equipamento ABI 310 (Applied Biosystems®).

#### 5.5.5 Determinação do ST

As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa SeaView v4.5.4, editadas utilizando o software Bioedit v.7.2.5 e comparadas com sequências disponíveis no banco de dados de MLST de *E. coli* (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) para a determinação de cada ST.

### 5.6 Análise estatística

Para análise da virulência em modelo de *G. mellonella* foram feitas curvas de sobrevivência utilizando o método Kaplan–Meier. A análise estatística para observar se existe diferença significativa na sobrevivência das larvas frente às amostras de tEAEC e aEAEC foi realizada pelo teste Log-Rank. Para analisar a diferença na produção de enzimas hidrolíticas, de sideróforos e de biofilme entre os grupos de tEAEC e aEAEC, foi realizado o Teste T de Student. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism 6 e o grau de significância estatística considerado foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

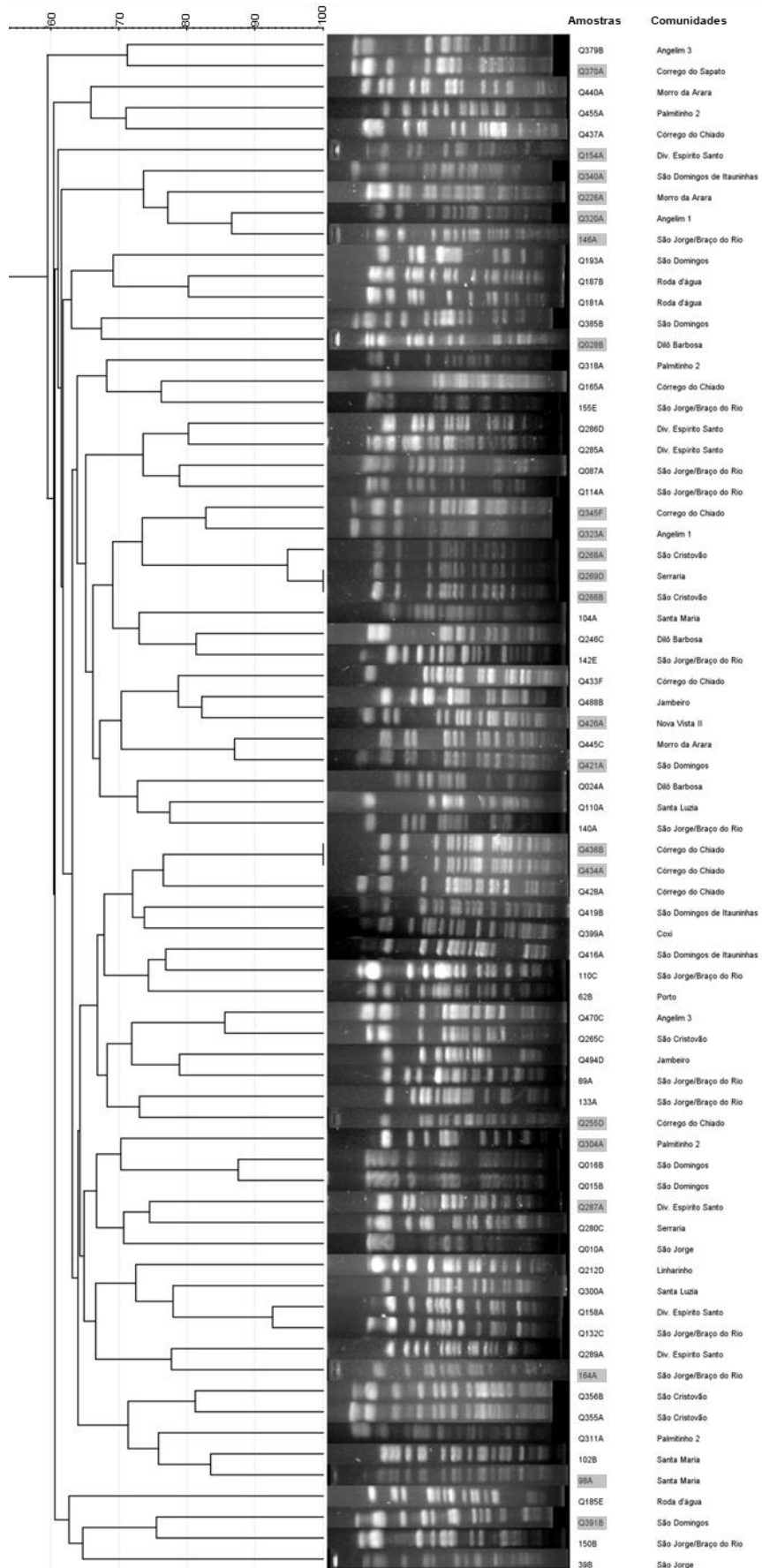
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão com enzima de restrição

A caracterização genotípica pela técnica de PFGE, realizada para os 73 isolados de EAEC, revelou a presença de 58 pulsotipos distintos. Alguns dos pulsotipos encontrados podem ser observados na Figura 9. A maioria dos pulsotipos (75,9% - 44/58) era composta por apenas uma amostra, 22,4% (13/58) eram compostos por duas amostras e apenas 1,7% (1/58), por três amostras (Figura 10). A análise de PFGE demonstrou uma alta heterogeneidade clonal com índice de similaridade de Dice variando de 6 a 100%.



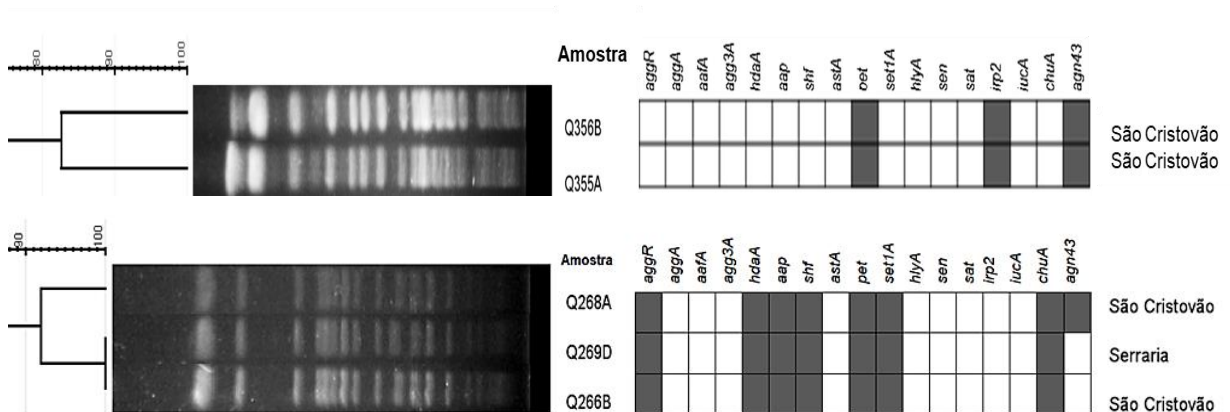
**Figura 9** - Foto ilustrativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando alguns dos padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de EAEC. Linhas: 1, 15: Marcador de tamanho molecular, variando de 48.5 a 727.5 kb; 2: amostra Q399A; 3: amostra Q416A; 4: amostra Q419B; 5: amostra Q421A; 6: amostra Q426A; 7: amostra Q428A; 8: amostra Q433F; 9: amostra Q434A; 10: amostra Q436B; 11: amostra Q437A; 12: amostra Q440A; 13: amostra Q445C; 14: amostra Q455A.



**Figura 10** - Dendrograma gerado pelo software "GelJ" das 73 amostras de EAEC com as respectivas comunidades quilombolas de origem. tEAEC destacadas com retângulo cinza.

Foi observado que, dos 14 grupos de amostras de mesmo pulsotipo (13 compostos por duas amostras cada e um composto por três amostras), sete foram de amostras da mesma comunidade e sete, de comunidades distantes. Somente dois grupos foram constituídos por amostras com o mesmo repertório de genes de virulência.

Não foi observada relação entre o perfil de genes de virulência (Anexo 1), o pulsotipo e a comunidade de origem para a maior parte das amostras com exceção de dois grupos provenientes da comunidade São Cristóvão e de sua comunidade vizinha Serraria. O primeiro grupo, constituído por duas amostras de aEAEC, apresentou o mesmo pulsotipo e o mesmo perfil de genes de virulência. O segundo grupo, composto de três amostras de tEAEC, em que duas apresentavam perfil de genes de virulência e de PFGE idênticos e foram provenientes de comunidades vizinhas, enquanto o outro isolado de mesmo pulsotipo diferia em apenas um gene e era da mesma comunidade de um dos outros dois isolados (São Cristóvão) (Figura 11).



**Figura 11** - Perfil de PFGE, genes de virulência e comunidade de origem de amostras pertencentes ao mesmo pulsotipo.

O perfil de fragmentação e a relação clonal entre as vinte amostras selecionadas para o ensaio de virulência em *G. mellonella* podem ser observados na Figura 12. A maior parte das amostras selecionadas não apresentou relação genotípica entre si, com exceção dos isolados de tEAEC Q266B e Q269D que apresentavam o mesmo perfil de genes de virulência e o mesmo pulsotipo. Os isolados 155E, Q110A e 110C, que apresentavam o mesmo perfil de genes de virulência, não apresentaram um padrão de fragmentação semelhante, assim como as amostras Q320A e Q323A. Os isolados Q226A e Q320A, que possuíam o mesmo perfil de genes de virulência,

não foram classificados como pertencentes ao mesmo pulsotipo, pois apresentaram menos de 80% de similaridade.

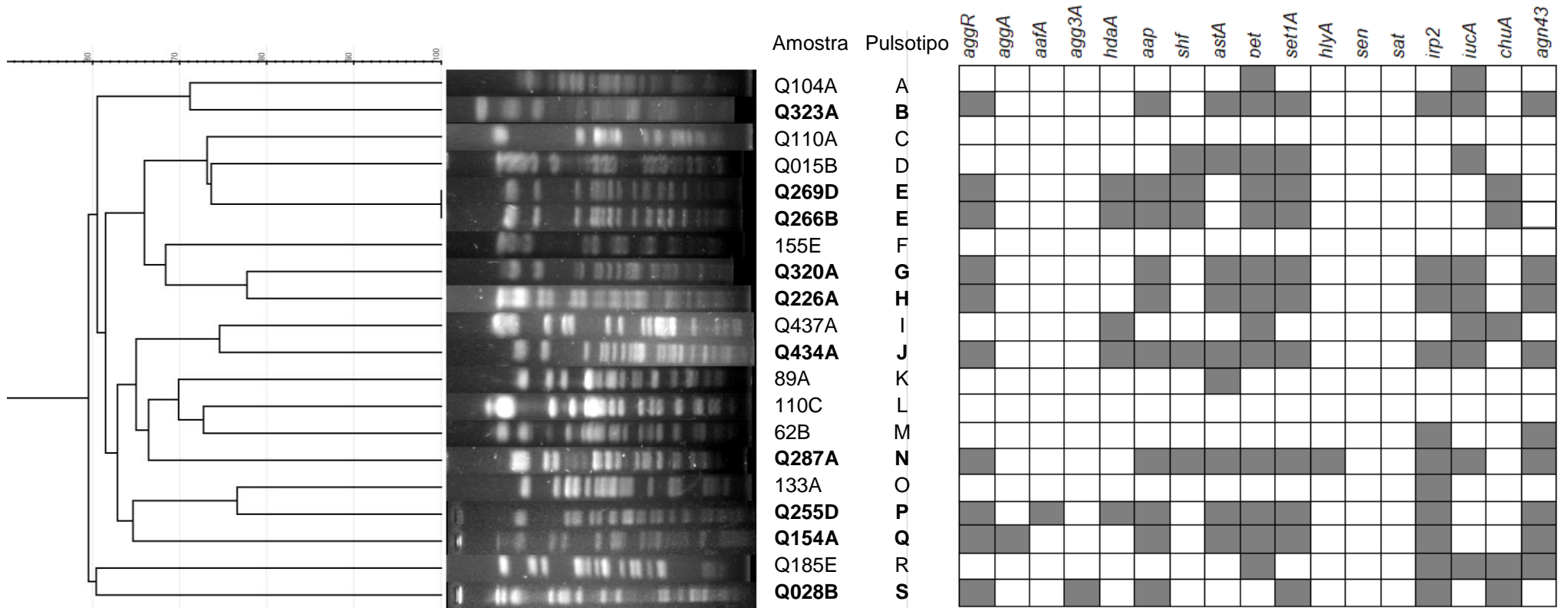
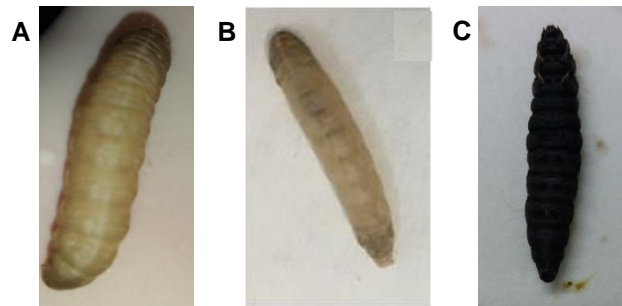


Figura 12 - Dendograma e perfil genético das amostras de tEAEC (em negrito) e aEAEC analisadas no ensaio de virulência em *G. mellonella*.

## 6.2 Ensaio de virulência em larvas de *Galleria mellonella*

Dez isolados de tEAEC, dez de aEAEC, as cepas referência EAEC 042, (tEAEC) e C1096 (aEAEC) e a cepa de *E. coli* não patogênica HB101, foram analisadas quanto ao potencial de virulência *in vivo* nas larvas de *G. mellonella* em concentrações que variaram de  $10^4$  a  $10^7$  UFC/larva.

Foi observado que somente os isolados de EAEC foram capazes de provocar melanização das larvas, enquanto que a cepa de *E. coli* não patogênica não induziu este processo (Figura 13).

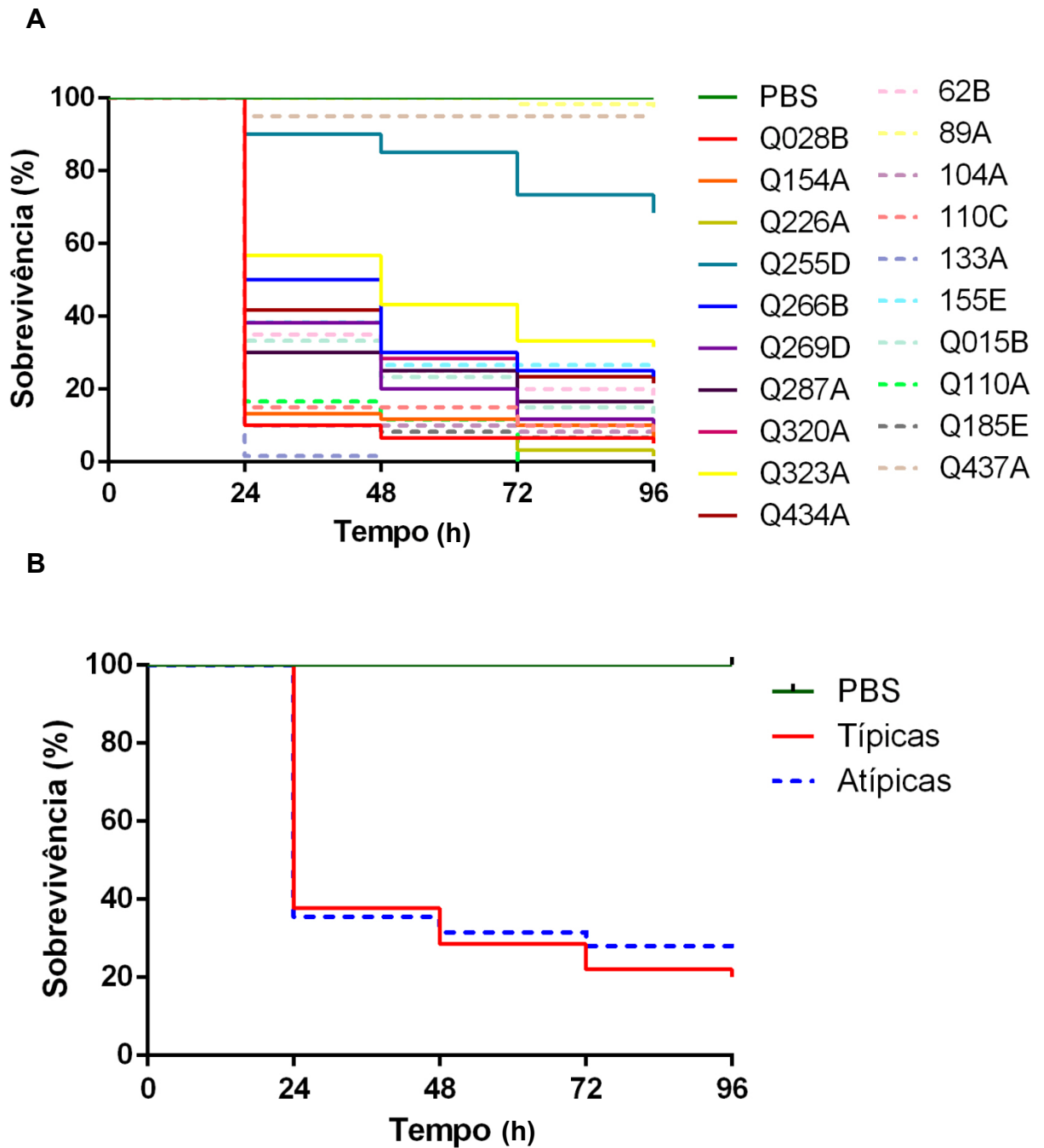


**Figura 13** - Larva de *G. mellonella*: A) não inoculada; B) após 96 h de infecção com a cepa *E. coli* não patogênica HB101; C) após 96 h de infecção com isolado de EAEC.

Os isolados de tEAEC e aEAEC provocaram a mortalidade das larvas de maneira dependente da concentração inoculada, uma vez que as larvas apresentaram alta sobrevivência com inóculo de  $10^4$  UFC/larva (entre 40 e 100%) e 100% de mortalidade com inóculos de  $10^6$  e  $10^7$  UFC/larva. Portanto, a concentração  $10^5$  UFC/larva foi a que apresentou maior diferenciação entre os isolados, sendo esta a concentração escolhida para as análises de virulência (Figura 14A). Além disso, observamos que o modelo de *G. mellonella* é capaz de realizar diferenciação de níveis de patogenicidade, como podemos observar pela variedade de curvas de sobrevivência na Figura 14A.

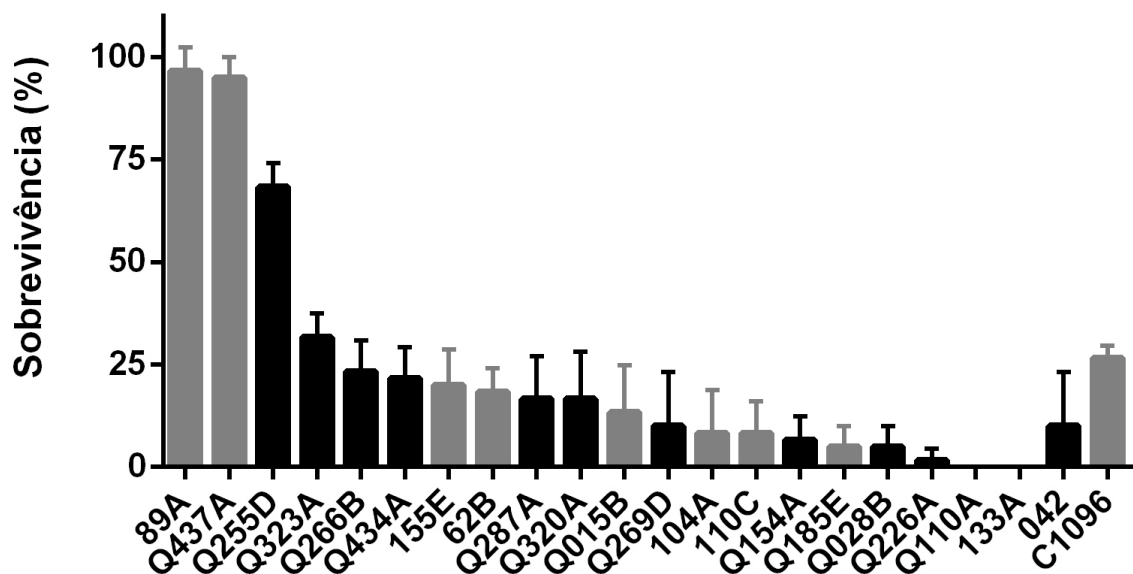
Realizando-se a análise comparativa entre os grupos tEAEC e aEAEC, observamos que as larvas inoculadas com as típicas apresentaram menor sobrevivência média ao final das 96h do que as larvas inoculadas com as atípicas ( $p = 0,04$ ) (Figura 14B).





**Figura 14** - Gráficos das curvas de sobrevivência de *G. mellonella* inoculadas com os vinte isolados de EAEC na concentração de  $10^5$  UFC/larva. A) Curvas de sobrevivência individualizadas por amostra inoculada, com as linhas contínuas representando as tEAEC e linhas tracejadas, as aEAEC. B) Curva de sobrevivência por grupos de amostras tEAEC e aEAEC ( $p = 0,04$ ).

Dentre todos os isolados, as aEAEC apresentaram a maior e a menor virulência no modelo, com 0% de sobrevivência após 96h de infecção (isolados Q110A e 133A) ou com sobrevivência próxima a 100% ao final do experimento (Q437A e 89A). Isso demonstra também uma heterogeneidade na virulência entre os isolados pertencentes ao mesmo grupo. Dentre as tEAEC, apenas um isolado (Q255D) demonstrou uma menor virulência, com sobrevivência superior a 50% ao final de 96 h (Figura 15).

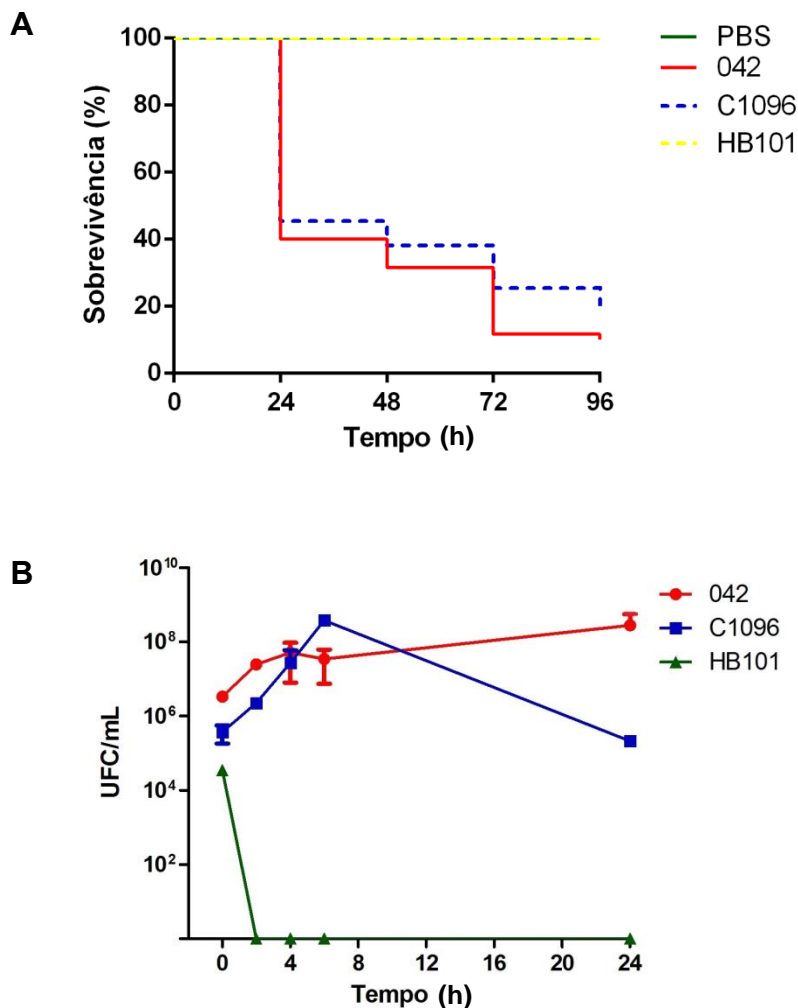


**Figura 15** - Percentual de sobrevivência de *G. mellonella* após 96h de infecção com os isolados de EAEC na concentração  $10^5$  UFC/larva. Dados obtidos de três experimentos independentes e expressos como a média  $\pm$  DP. EAEC típicas representadas em preto e EAEC atípicas em cinza.

Não foi observada relação entre número de genes de virulência e a virulência no modelo de *G. mellonella*, ou seja, amostras com maior conjunto de genes não provocaram maior mortalidade nas larvas. Os isolados Q110A e 133A, que levaram a 100% de mortalidade, apresentavam zero e um gene, respectivamente, enquanto que o isolado Q255D, que apresentou mais de 50% de sobrevivência, possuía nove dos genes pesquisados.

As cepas referência de tEAEC (EAEC 042) e aEAEC (C1096) apresentaram alta mortalidade no modelo, porém, sem diferença significativa entre elas ( $p > 0,05$ ). Já a cepa de *E. coli* não patogênica HB101 não foi capaz de matar as larvas em nenhuma das concentrações testadas (Figura 16A).

A fim de observar se existia diferença na proliferação bacteriana durante a infecção pelas cepas referência de EAEC típica e atípica e de *E. coli* não patogênica, foi feita a remoção da hemolinfa das larvas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 24 h após a infecção com os isolados na concentração  $10^5$  UFC/larva para a contagem de UFC (Figura 16B). Foi observado que a cepa de EAEC 042 (típica) se replica dentro da larva, aumentando sua concentração em uma ordem de grandeza nas primeiras 6 h de infecção, e continua se proliferando mesmo após 24 h de infecção. Por outro lado, a cepa de EAEC C1096 (atípica) leva a um aumento de mais de duas ordens de grandeza nas primeiras 6 h de infecção, porém sua concentração diminui após 24h de infecção. Em contraste, a cepa não patogênica (HB101) é completamente eliminada da hemolinfa com apenas 2 h de infecção.



**Figura 16** - A) Curvas de sobrevivência de *G. mellonella* inoculadas com as cepas referência na concentração de  $10^5$  UFC/larva ( $p > 0,05$  entre 042 e C1096). B) Quantificação da carga bacteriana na hemolinfa em 0, 2, 4, 6 e 24 h após a infecção com as cepas referência na concentração  $10^5$  UFC/larva. Cepas referência: EAEC 042 (típica), EAEC C1096 (atípica) e *E. coli* não patogênica HB101.

### 6.3 Caracterização fenotípica de fatores de virulência

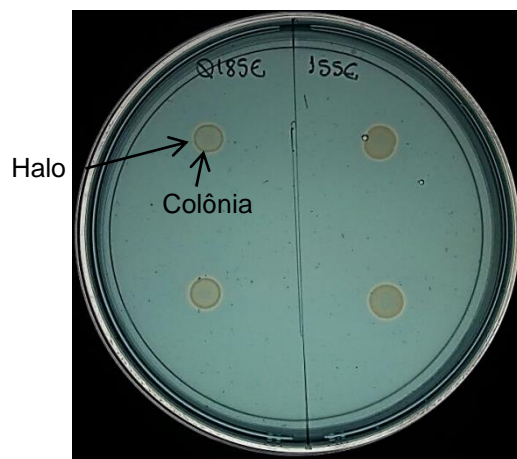
#### 6.3.1 Ensaio de produção de enzimas hidrolíticas

Foram pesquisadas as enzimas fosfolipase, protease, esterase e hemolisina em dez dos isolados de EAEC analisados no ensaio de virulência em *G. mellonella*.

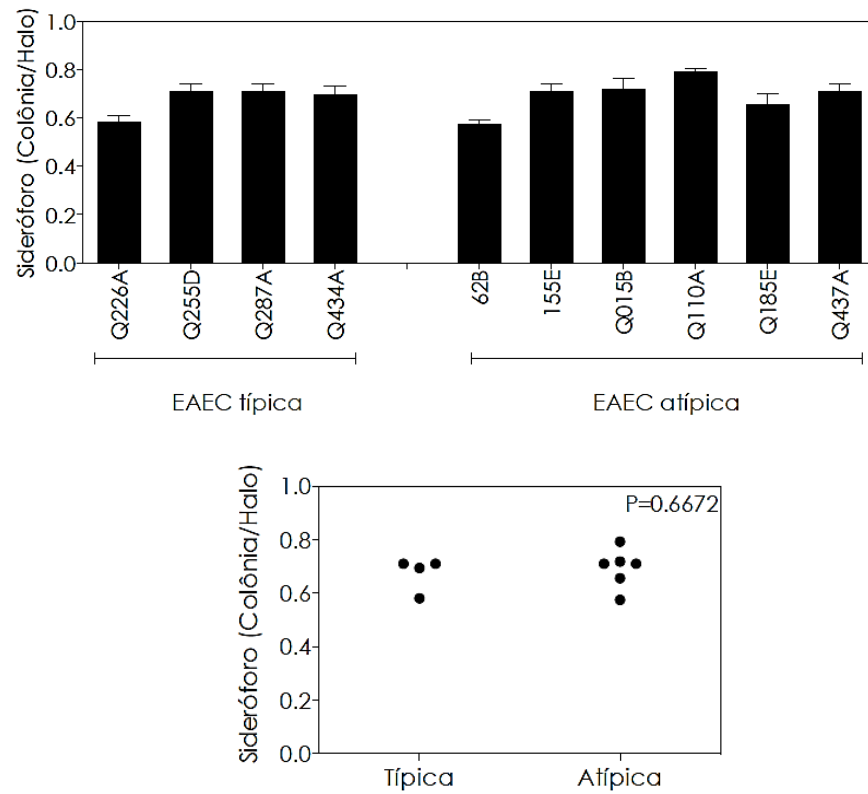
Não foi observada produção de fosfolipase, protease, esterase por nenhuma das amostras. Apenas a amostra Q287A (tEAEC) produziu hemolisina, porém em quantidade muito reduzida, o que não permitiu a realização da medida do halo para quantificação.

#### 6.3.2 Ensaio de produção de sideróforos

Todas as amostras analisadas foram capazes de produzir sideróforos (Figura 17). Seis isolados foram classificados como “fracos produtores” e quatro foram classificados como “bons produtores”, sendo dois deles tEAEC e dois aEAEC. Não foi observada diferença significativa entre as tEAEC e aEAEC ( $p > 0,05$ ) (Figura 18).



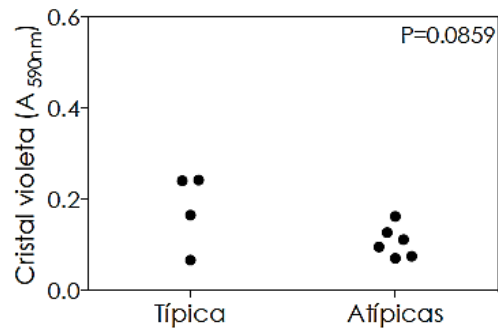
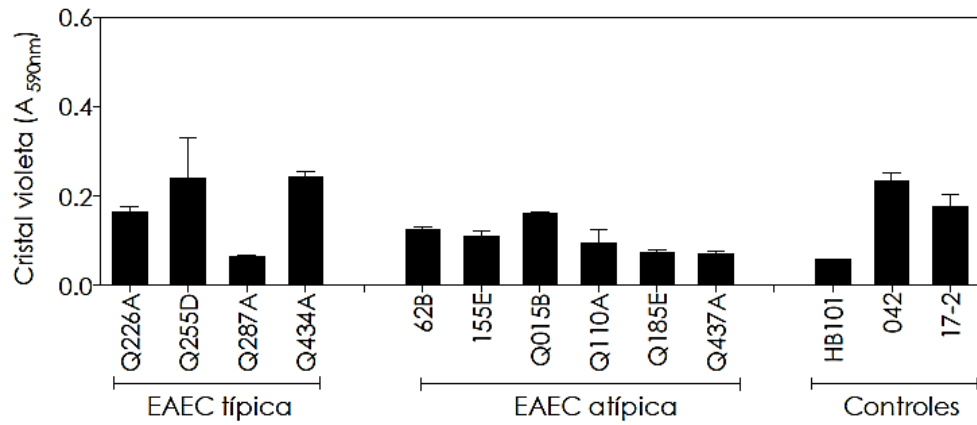
**Figura 17** - Detecção da produção de sideróforos por amostras de EAEC evidenciando o halo e a colônia.



**Figura 18** - Produção de sideróforos pelas amostras de EAEC analisadas e comparação entre os grupos tEAEC e aEAEC.

### 6.3.3 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica

No ensaio de formação de biofilme e considerando-se o critério de Stepanovic et al. (2007), apenas a amostra Q287A não foi considerada formadora de biofilme. Além disso, não foi observada diferença significativa na formação de biofilme entre tEAEC e aEAEC ( $p > 0,05$ ) (Figura 19).



**Figura 19** - Resultado do ensaio de formação de biofilme corado com cristal violeta e comparação entre os grupos tEAEC e aEAEC. Cepas utilizadas como controle: EAEC 042 (tEAEC), EAEC 17-2 (tEAEC), HB101 (*E. coli* não patogênica)

#### 6.4 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Dez amostras dentre as analisadas no teste de virulência em *G. mellonella*, sendo quatro tEAEC e seis aEAEC, que apresentavam diferentes pulsotipos, foram submetidas à tipagem molecular por meio da técnica MLST. Foi observado que esses isolados pertenceram a STs distintos, como apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Resultados do *Multilocus Sequence Typing* (MLST) de 10 amostras de EAEC.

Amostra	Pulsotipo	ST	CC	Perfil alélico						
				<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>
Q110A	C	2481	nd	6	11	4	8	42	8	2
Q015B	D	1178	nd	10	27	5	8	12	1	2
155E	F	1286	nd	10	174	4	8	8	8	2
Q226A	H	730	nd	8	7	1	1	8	18	6
Q437A	I	452	nd	76	43	19	37	30	1	25
Q434A	J	40	40	6	4	5	26	20	8	14
62B	M	453	86	99	6	33	33	24	8	7
Q287A	N	443	205	6	19	15	16	9	8	7
Q255D	P	200	40	6	4	5	26	7	8	14
Q185E	R	144	nd	13	43	9	36	30	44	25

ST: *sequence type*; CC: complexo clonal; nd: não descrito.

Foram encontrados três complexos clonais (CC86, CC40 e CC205) dentre os dez STs, sendo que as amostras Q255D (ST200) e Q434A (ST40), ambas tEAEC, pertencem ao mesmo complexo clonal (CC40). Os demais STs não foram associados a nenhum complexo clonal descrito até o momento.

Os genes que apresentaram maior variação foram *fumC* e *mdh* com 8 alelos diferentes cada.

## 7 DISCUSSÃO

Considerando que a EAEC é um patotipo caracterizado pela sua heterogeneidade quanto aos potenciais fatores de virulência, com nenhum deles estando uniformemente presente em todos os isolados (OKEKE et al., 2000; SUZART et al., 2001; OKEKE et al., 2010), e o fato de que as amostras de EAEC analisadas no presente estudo foram isoladas de crianças que vivem áreas geográficas semi-isoladas, investigamos se este fato impactaria nessa conhecida diversidade por meio de metodologias fenotípicas e moleculares discriminatórias da relação clonal entre elas.

Desta forma, ao utilizar a metodologia de eletroforese em campo pulsado após digestão com enzima de restrição das amostras de tEAEC e aEAEC foi observada uma grande diversidade de padrões de fragmentação. Este resultado corrobora outros estudos que utilizaram a mesma metodologia para analisar a epidemiologia molecular de amostras de EAEC, incluindo estudo com amostras de EAEC provenientes do Rio de Janeiro, que encontraram alta diversidade genética entre elas (ADACHI et al., 2001; KAHALI et al., 2004; REGUA-MANGIA et al., 2009). Porém, os estudos realizados anteriormente observaram grande heterogeneidade clonal em isolados clínicos de centros urbanos e apenas um estudo, até o momento, observou a heterogeneidade de EAEC em uma pequena cidade rural da Nigéria (OKEKE et al., 2010). Portanto, até o momento, não se havia avaliado se esta heterogeneidade seria mantida em amostras provenientes de comunidades semi-isoladas.

A diversidade encontrada de pulsotipos é um reflexo dos diferentes perfis de genes de virulência dos isolados analisados que apresentaram ainda variedade de plasmídios entre eles, especialmente os de baixo peso molecular, como previamente observado em nosso laboratório para as mesmas amostras (MONFARDINI, 2012; SILVA, 2016; Anexo 3).

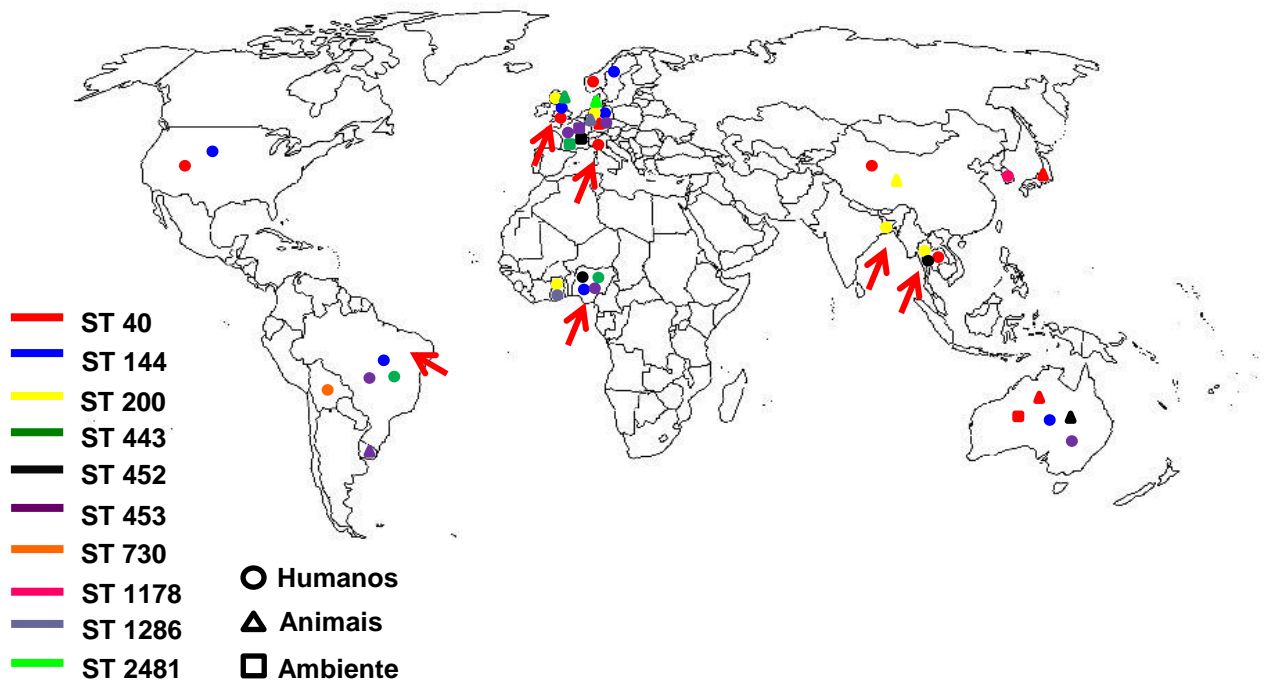
Portanto, utilizando a metodologia de PFGE, que é considerada padrão ouro para tipagem molecular de diversas bactérias incluindo *E. coli* (DURMAZ et al., 2009), observamos uma grande diversidade clonal sem restrição geográfica entre os isolados das diversas comunidades, visto que amostras de mesmo pulsotipo foram encontradas em comunidades distantes, mesmo estas sendo semi-isoladas. Como



consequência dessa grande diversidade genética, não foi observada relação entre o perfil de genes de virulência, o pulsotipo e a comunidade de origem para a maioria dos isolados. Sendo assim, por não haver relação genotípica entre elas, essas amostras constituem cepas epidemiologicamente independentes.

Apesar da técnica de PFGE ser a mais utilizada e recomendada para tipagem bacteriana, esta metodologia não permite a comparação a nível global em diferentes períodos de tempo, sendo utilizada apenas para estudos de epidemiologia local em curto prazo (MAIDEN et al., 1998). A fim de se realizar um comparativo global, a técnica de MLST tem sido aplicada, inclusive para análise evolutiva de cepas patogênicas de *E. coli* (OKEKE et al., 2010; DALLMAN et al., 2012). Por esse motivo, dez isolados foram submetidos à análise de MLST e foi observado que estes pertenciam a dez STs distintos com apenas duas amostras pertencendo ao mesmo complexo clonal (ST40cplx que compreende ST40 e ST200). Até o momento, pouco se sabe sobre a distribuição de STs de EAEC no Brasil, visto que somente um estudo, de nosso conhecimento, analisou isolados do Brasil por essa técnica (NUNES et al., 2017) e a maioria dos dados disponíveis no banco de dados refere-se a isolados da Europa, Ásia e África ([http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains)).

Os STs 40, 144, 200 e 453 de nossas amostras já foram descritos para EAEC em países como Itália (ST40), Reino Unido (ST40/ST200 - ST40cplx), Tailândia (ST40/ST200 – ST40cplx), Bangladesh (ST200), Nigéria (ST144 e ST453) e Brasil (ST144), bem como para outros patotipos em outros países (NUNES et al., 2017; [http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains)). Os demais STs encontrados (ST443, ST730, ST1178, ST1286 e ST2481) foram descritos somente para outros patotipos de *E. coli*, portanto nosso estudo compreende o primeiro relato desses STs em EAEC (Figura 20).



**Figura 20** - Países onde já foram descritos os STs de *E. coli* encontrados em nosso estudo. Setas vermelhas indicam os países onde os STs foram descritos para EAEC (Itália – ST40, Reino Unido – ST 40 e ST200, Tailândia - ST40 e ST200, Bangladesh – ST 200, Nigéria – ST144 e 453 e Brasil – ST144).

Dois dos STs encontrados em isolados de crianças quilombolas (ST144 e ST453) já foram descritos em cepas de EAEC da Nigéria. Como as comunidades quilombolas são formadas por descendentes de escravos e a Nigéria era um dos países de origem dos escravos brasileiros, podemos sugerir que essas linhagens de EAEC foram introduzidas nessas comunidades naquele contexto. Por outro lado, não podemos excluir outras fontes de aquisição dessas amostras bacterianas visto que, embora os indivíduos quilombolas vivam em áreas semi-isoladas, muitos deles já sofreram alguma miscigenação.

A diversidade de STs observada em um conjunto de amostras do mesmo contexto epidemiológico confirma a grande heterogeneidade de EAEC, mesmo sendo de comunidades rurais semi-isoladas, com contato restrito entre elas e com centros urbanos. Além disso, os isolados pertencentes a diferentes STs sugerem linhagens evolutivas distintas, corroborando com Okeke et al (2010), que demonstraram que o padrão de aderência agregativa teria sido adquirido por diferentes linhagens de *E. coli* por diferentes vias.

Apesar das tEAEC terem sido mais caracterizadas, os estudos contemplando as aEAEC ainda são escassos. Sugere-se na literatura que as tEAEC sejam mais virulentas, por carregarem o regulon *AggR* que regula uma série de genes de virulência (SARANTUYA et al., 2004; MORIN et al., 2013), porém, as aEAEC já foram associadas a dois importantes surtos, um deles em um berçário na Sérvia (COBELJIĆ et al., 1996) e outro em 2697 crianças no Japão (ITOH et al., 1997). Além disso, temos observado que embora as tEAEC sejam mais frequentes do que as aEAEC, alguns estudos epidemiológicos têm revelado uma frequência maior de aEAEC, inclusive entre as nossas amostras (HUANG et al., 2003; HUANG et al., 2007; OPINTAN et al., 2010; MONFARDINI, 2012), o que pode indicar sua emergência como patógeno. Comparamos, portanto, a virulência de isolados de tEAEC e aEAEC em modelo *in vivo* de *G. mellonella* devido a suas vantagens frente a outros modelos invertebrados e modelos mamíferos.

Avaliando a diferença entre os grupos tEAEC e aEAEC, observamos que as tEAEC apresentaram virulência média maior do que as aEAEC ( $p=0,04$ ), porém a diferença entre as curvas foi muito pequena e, analisando individualmente os isolados, observamos que a maior parte das amostras de aEAEC apresentou alta virulência no modelo. Portanto, embora Sarantuya et al. (2004) proponham *aggR* (presente nas tEAEC) como marcador de cepas verdadeiramente virulentas de EAEC, sugerimos diante de nossos resultados que as amostras de aEAEC podem ser tão virulentas quanto as de tEAEC, pelo menos no modelo *in vivo* estudado, e que este aspecto se deveria a fatores não relacionados a *aggR* ou aos genes por ele regulados.

Apesar da maior parte das amostras de aEAEC terem apresentado alta virulência, dois isolados apresentaram-se praticamente avirulentos (89A e Q437A) com quase 100% de sobrevivência ao final do teste (96 h). Esse resultado sugere que os genes de virulência apresentados por esses isolados (*astA*, *hdaA*, *pet*, *iucA* e *chuA*), responsáveis pela síntese da toxina EAST, adesina, proteína que cliva espectrina ou sideróforos, não sejam responsáveis pela virulência de EAEC nesse modelo, ou que se algum deles efetivamente contribuísse para a virulência, poderia não ter sido expresso.

Em relação aos estudos já realizados com EAEC em *G. mellonella*, Khalil e colaboradores analisaram apenas isolados clínicos de tEAEC, visto que foram classificadas como EAEC as cepas que possuíam o gene *aggR*, não abrangendo as aEAEC (KHALIL et al., 2016). Jønsson et al., 2016 padronizaram a utilização do modelo de *G. mellonella* para estudos de patogenicidade de EAEC, porém, este estudo também analisou somente seis isolados de tEAEC que albergavam quatro fatores de virulência clássicos (Regulador *AggR*, sistema de secreção tipo IV, dispersina e seu transportador) e comparou-os com cepas de *E. coli* não patogênicas, não contemplando a heterogeneidade existente também entre as tEAEC e aEAEC, como o realizado em nosso estudo. Foi observado nesses dois estudos que a morte das larvas depende da concentração de EAEC inoculada, assim como observado em nosso estudo tanto para tEAEC quanto aEAEC.

A cepa de *E. coli* não patogênica HB101 não foi capaz de induzir melanização e morte em nenhuma das concentrações testadas, assim como já foi demonstrado para outras cepas não patogênicas de *E. coli* em *G. mellonella* (LEUKO, RAIVIO, 2012; PEREIRA et al., 2015; JØNSSON et al., 2016). Este achado foi justificado por meio da análise da carga bacteriana na hemolinfa que demonstrou que após 2 h de infecção, a cepa de *E. coli* HB101 é totalmente eliminada pelo sistema imunológico em contraposição às cepas referência de tEAEC ou aEAEC, que levam à melanização e morte das larvas. Neste caso, estas cepas se multiplicam na larva, sendo a mortalidade, possivelmente, causada pelo aumento da quantidade de bactéria dentro da larva, como foi previamente demonstrado em estudos com *Streptococcus pneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e com a cepa EAEC 042 (EVANS; ROZEN, 2012; PEREIRA et al., 2015; JØNSSON et al., 2016). Cabe destacar que a cepa referência de aEAEC C1096 teve a sua concentração reduzida após 24 h de infecção, o que sugere que as tEAEC sejam mais virulentas nesse modelo por continuarem se multiplicando mesmo nos tempos mais tardios da infecção.

Também observamos que o modelo de *G. mellonella* é capaz de diferenciar isolados em diferentes níveis de patogenicidade. Entretanto, apesar de termos análise de grande repertório de genes de virulência e aspectos fenotípicos, não podemos inferir quais os fatores de virulência que efetivamente contribuiriam para este aspecto. Isto se deve ao fato de não termos observado relação entre os genes de virulência dos

isolados analisados e a virulência em *G. mellonella*, pois as amostras que levaram à maior mortalidade das larvas tinham entre zero e um gene de virulência e amostras que não apresentaram alta virulência possuíam entre quatro e nove genes. Desta forma, fatores ainda não relacionados à virulência de tanto tEAEC quanto aEAEC podem estar envolvidos na virulência *in vivo*.

Jønsson et al. (2016) sugeriram, por comparação com a adesina Afa/Dr (*Dr binding adhesins*) que apresentaram relação com a patogenicidade de ExPEC (CIESIELCZUK et al., 2015), que as AAF estariam relacionadas à alta virulência de EAEC no modelo, porém, não foi feita a análise de virulência de isolados com e sem AAF para comprovar essa suposição. Como a presença dessas adesinas fimbriais é extremamente baixa, apenas cinco dos isolados testados em nosso estudo possuíam alguma das AAF e quatro deles apresentaram alta virulência (abaixo de 40% de sobrevivência). Portanto, a maioria dos isolados com alta virulência (13/17) não apresentava os genes de AAF, sugerindo que fatores adicionais também poderiam estar relacionados à virulência.

A falta de relação entre os genes de virulência de EAEC e a virulência no modelo, nos leva a sugerir que os genes importantes para a patogênese em humanos podem não desempenhar a mesma função nas larvas de *G. mellonella* ou ainda, que possa haver a participação de fatores de virulência não pesquisados por nós, como *afa/dra* (*Dr binding adhesins*), *kpsMTII* (*group 2 capsule synthesis*) e *agg5A* (AAF/V). Devemos considerar ainda que a via de infecção das larvas pela hemolinfa difere da via de patogênese natural da EAEC, a via oral. Em contrapartida, estudo que analisou a virulência de ExPEC em *G. mellonella* encontrou correlação entre o número de genes de virulência e a mortalidade das larvas, já que esse patotipo causa infecção extra intestinal incluindo bacteremia e, portanto, os isolados foram analisados em seu sítio natural de infecção (WILLIAMSON et al., 2014). Desta forma, podemos inferir que os fatores de virulência de EAEC apresentariam alguma especificidade com as células epiteliais intestinais. O ensaio de virulência com EAEC não foi realizado pela via oral devido à dificuldade de padronização do inóculo bacteriano que seria ingerido pelas larvas.

Raros são os estudos que relacionam virulência com os STs de amostras de EAEC (CHATTAWAY et al., 2014). Estes pesquisadores analisaram 564 amostras

provenientes da Nigéria, Bangladesh e Reino Unido e observaram associação significativa entre o complexo clonal ST40cplx e doença. Porém, avaliando as amostras pertencentes a este mesmo complexo (Q434A e Q255D) no modelo de *G. mellonella*, observamos que apenas uma delas apresentou alta virulência, enquanto a outra, a menor virulência *in vivo* dentre as tEAEC. Isto sugere que não necessariamente as amostras pertencentes ao ST40cplx apresentariam o mesmo grau de virulência.

Em relação aos ensaios de caracterização fenotípica de fatores de virulência, não observamos diferença significativa entre os grupos tEAEC e aEAEC quanto à produção de sideróforos e biofilme. Apesar da importância das enzimas na patogênese de diversos microrganismos (GUIGNOT et al., 2000; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014; RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2016), não foi observada produção significativa desses fatores de virulência nas nossas amostras. Não foi possível estabelecer relação entre a virulência no modelo de *G. mellonella* e as características fenotípicas de virulência, tendo em vista que: (i) todos os isolados produziram sideróforos; (ii) com exceção de uma amostra, todas as demais produziram biofilme; (iii) somente um isolado produziu alguma enzima hidrolítica e em quantidade muito reduzida.

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram aspectos importantes tanto da diversidade de EAEC quanto da sua virulência, visto que nenhum estudo avaliou anteriormente a heterogeneidade de amostras de EAEC provenientes de comunidades semi-isoladas nem tampouco comparou a virulência de tEAEC e aEAEC *in vivo*. Foi observado que a alta heterogeneidade de EAEC se mantém nas comunidades quilombolas mesmo estas sendo semi-isoladas, pois a maior parte das amostras não apresentou relação genotípica entre si. Além disso, foi realizada uma análise epidemiológica de STs de EAEC presentes no Brasil, dado que até o momento é escasso na literatura, com a descrição de novos STs em amostras de EAEC. Em relação às análises de virulência, ao contrário do que se sugere na literatura, pelo modelo de estudo, as aEAEC demonstraram que podem ser tão virulentas quanto as tEAEC.

## 8 CONCLUSÕES

- i. Foi observada uma alta heterogeneidade clonal entre as amostras de EAEC das comunidades quilombolas;
- ii. Apesar de isolados de mesmo pulsotipo terem sido encontrados em uma mesma ou em comunidade quilombola vizinha, nem sempre essa restrição geográfica foi observada;
- iii. Amostras de aEAEC podem ser tão virulentas quanto de tEAEC em modelo de *G. mellonella*, porém, as tEAEC apresentaram maior virulência média do que as aEAEC;
- iv. EAEC 042 e C1096 se multiplicam nas larvas de *G. mellonella*, enquanto a *E. coli* não patogênica HB101 é rapidamente eliminada da hemolinfa e por isso não leva à melanização e morte das larvas;
- v. Não foi observada relação entre a virulência *in vivo*, os genes de virulência e a produção de enzimas hidrolíticas, sideróforos e biofilme pesquisados;
- vi. As amostras de EAEC apresentaram diferentes STs, representando linhagens evolucionárias distintas.
- vii. Novos STs, ainda não descritos em EAEC, foram encontrados nesse estudo.

## 9 REFERÊNCIAS

ADACHI, J. A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a Major Etiologic Agent in Traveler's Diarrhea in 3 Regions of the World. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 12, p. 1706–1709, 2001.

ALI, M.M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 5, p. 589-596, 2014.

AMAYA, E. et al. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 216-222, 2011.

ANDREJKO, M.; MIZERSKA-DUDKA, M. Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. 1, p. 16–26, 2011.

BANGAR, R.; MAMATHA, B. Identification of Enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, south India. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 62, n. 1, p. 8-12, 2008.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; BOUGUE, C.L.E. Identification of an Aggregative Adhesion Fimbria (AAF) Type III-Encoding Operon in Enteroaggregative *Escherichia coli* as a Sensitive Probe for Detecting the AAF-Encoding Operon Family. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4302–4311, 2002.

BETTS, J.W. et al. In Vitro and In Vivo Activities of Tigecycline-Colistin Combination Therapies against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3541–3546, 2014.

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

BRENNAN, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 153–157, 2002.



BROWN, S.E. et al. A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 11, p. 792–800, 2009.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 597–603, 2013.

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

CHATTAWAY, M.A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Have Evolved Independently as Distinct Complexes within the *E. coli* Population with Varying Ability to Cause Disease. **Plos one**, v. 21, p. 1–17, 2014.

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

CIESIELCZUK, H. et al. Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 145–151, 2015.

ČOBELJIĆ, A.M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Associated with an Outbreak of Diarrhoea in a Neonatal Nursery Ward. **Epidemiology and Infection**, v. 117, n. 1, p. 11–16, 1996.

CROXEN, M.A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v. 26, n. 1, p. 822–880, 2013.

CZECZULIN, J.R. et al. Aggregative Adherence Fimbria II, a Second Fimbrial Antigen Mediating Aggregative Adherence in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4135–4145, 1997.

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

DALLMAN, T. et al. Characterization of a Verocytotoxin-Producing Enteroaggregative *Escherichia coli* Serogroup O11:H21 Strain Associated with a Household Outbreak in Northern Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4116–4119, 2012.

DESBOIS, A.P.; COOTE, P.J. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an *in vivo* model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1785–1790, 2011.

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, 2006.

DURMAZ, R. et al. The Optimization of a Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for the Typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62, p. 372–377, 2009.

DUTTA, S. et al. Shifting serotypes, plasmid profile analysis and antimicrobial resistance pattern of shigellae strains isolated from Kolkata, India during 1995 – 2000. **Epidemiology and Infection**, v. 129, p. 235–243, 2002.

ELIAS, W.P. et al. Organization of Biogenesis Genes for Aggregative Adherence Fimbria II Defines a Virulence Gene Cluster in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 6, p. 1779–1785, 1999.

Enterobase. Disponível em <  
[http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains)>. Acesso em:  
 Novembro de 2017

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

EVANS, B.A.; ROZEN, D.E. A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 2653–2660, 2012.

FARSHAD, S. et al. Characterization of *Shigella* Strains in Iran by Plasmid Profile Analysis and PCR Amplification of *ipa* Genes. **Journal of Bacteriology**, v. 44, n. 8, p. 2879–2883, 2006.

FASANO, A. et al. *Shigella Enterotoxin 1*: An Enterotoxin of *Shigella flexneri 2a* Active in Rabbit Small Intestine In Vivo and In Vitro. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. June, p. 2853–2861, 1995.

FRANÇA, F.L.S. et al. Genotypic and Phenotypic Characterisation of Enteroaggregative *Escherichia coli* from Children in Rio de Janeiro. **Plos one**, v. 8, n. 7, 2013.

GASPAR, F. et al. Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model : the role of *fsrB* and *gelE*. **Microbiology**, v. 155, p. 3564–3571, 2009.

GUIGNOT, J. et al. Pyelonephritogenic Diffusely Adhering *Escherichia coli* EC7372 Harboring Dr-II Adhesin Carries Classical Uropathogenic Virulence Genes and Promotes Cell Lysis and Apoptosis in Polarized Epithelial Caco-2 / TC7 Cells. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 7018–7027, 2000.

GUYER, D.M. et al. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 53-66, 2000.

HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, G.E.; NATARO, J.P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 254, n. 1, p.12-8, 2005.

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

HERAS, J. et al. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. **BMC Bioinformatics**, v. 16, p. 1–8, 2015.

HUANG, D.B; JIANG, Z; DUPONT, H.L. Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 5, p. 506–508, 2003.

HUANG, D.B. et al. A review of an emerging enteric pathogen: Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 1303–1311, 2006.

HUANG, D.B. et al. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1386–1392, 2007.

HYTTIA-TREES, E.K. et al. Recent developments and future prospects in subtyping of foodborne bacterial pathogens. **Future Medicine**, v. 2, n. 2, p. 175–185, 2007.

INSUA, J.L. et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis by Infection of the Wax Moth *Galleria mellonella*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3552–3565, 2013.

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.

IZQUIERDO, M. et al. Identification of cell surface-exposed proteins involved in the fimbria-mediated adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to intestinal cells. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 4, p. 1719–1724, 2014.

JANDER, G.; RAHME, L.G; AUSUBEL, F.M. Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3843–3845, 2000.

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

JOYCE, S.A.; GAHAN, C.G.M. Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. **Microbiology**, v. 156, p. 3456–3468, 2010.

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

JØNSSON, R. et al. The wax moth *Galleria mellonella* as a novel model system to study Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Virulence**, v. 0, n. 0, p. 1–6, 2016.

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

KAPER, J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 355-356, 2005.

KAHALI, S. et al. Virulence Characteristics and Molecular Epidemiology of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates from Hospitalized Diarrheal Patients in Kolkata , India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4111–4120, 2004.

KHALIL, U. et al. Phenotypic and genotypic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from pediatric population in Pakistan. **APMIS**, n. 7, p. 872–880, 2016.

KJAERGAARD, K.; SCHEMBRI, M.A.; RAMOS, C. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 695-702, 2000.

LEE, Y.S. et al. Purification , cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 65–72, 2004.

LEUKO, S.; RAIVIO, T.L. Mutations That Impact the Enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx Envelope Stress Response Attenuate Virulence in *Galleria mellonella*. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 9, p. 3077–3085, 2012.

LORENZO, V.D.E.; NEILANDS, J.B. Characterization of iucA and iucC Genes of the Aerobactin System of Plasmid Co1V-K30 in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 167, n. 1, p. 350–355, 1986.

LOUDEN, B.C; HAARMANN, D.; LYNNE, A.M. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. **Journal of Microbiology & Biology Education**, v. 12, n. 1, p. 51–53, 2011.

LOZER, D.M. Patotipos de *Escherichia coli* diarreio gênica em crianças quilombolas com e sem diarreia, do norte do Espírito Santo. 2011. 129f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2011

LOZER, D.M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infectious Diseases**, 13:418, 2013.

MAIDEN, M.C.J. et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 3140–3145, 1998.

MARTINI, C. et al. The Polyamine N -Acetyltransferase-Like Enzyme PmvE Plays a Role in the Virulence of *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 1, p. 364–371, 2015.

MÉNARD, L.P.; DUBREUIL, J.D. Critical Reviews in Microbiology Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 (EAST1): A New Toxin with an Old Twist. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 281, p. 43–6043, 2002.

MENDEZ-ARANCIBIA, E. et al. Prevalence of Different Virulence Factors and Biofilm Production in Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates Causing Diarrhea in Children in Ifakara (Tanzania). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 985–989, 2008.

MONFARDINI, M.V. Caracterização genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e com padrão *chain-like adhesion* (CLA) isoladas de crianças com e sem diarreia. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2012

MORENO, A. C. R. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brasil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, p. 50-57, 2010.

MORGAN, J.K.; ORTIZ, J.A.; RIORDAN, J.T. Microbial Pathogenesis The role for TolA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and virulence gene transcription. **Microbial Pathogenesis**, v. 77, p. 42–52, 2014.

MORIN, N. et al. *Escherichia coli* in vitro and in vivo. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 58, p. 344–355, 2010.

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

MOWLDS, P.; KAVANAGH, K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 165, p. 5–12, 2008.

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842–3850, 2005.

NATARO, J.P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.

NATARO, J.P. et al. Aggregative Adherence Fimbriae I of Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediate Adherence to HEp-2 Cells and Hemagglutination of Human Erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2297–2304, 1992.

NATARO, J.P. 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, J.P. et al. Identification and Cloning of a Novel Plasmid-Encoded Enterotoxin of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* Strains. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4721–4728, 1995.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

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

NAVARRO-GARCIA, F. et al. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the *Enterobacteriaceae* family, is a potent mucus secretagogue. **Infectious Immunology**, v. 78, n. 10, p. 4101- 4109, 2010.

NEMOY, L. L. et al. Multilocus Sequence Typing versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1776–1781, 2005.

NUNES, K.O. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. **Pathogens and Disease**, v. 75, p. 1–4, 2017.

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, p. 252–260, 2000.

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

OKEKE, I.N. et al. *Multi-Locus Sequence Typing* of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates from Nigerian Children Uncovers Multiple Lineages. **Plos One**, v. 5, n. 11, 2010.

OKHUYSEN, P.C.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 503–550, 2010.

OPINTAN, J.A. et al. Pediatric Diarrhea in Southern Ghana : Etiology and Association with Intestinal Inflammation and Malnutrition. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 4, p. 936–943, 2010.

PARK, S.Y. et al. Effects of two hemolymph proteins on humoral defense reactions in the wax moth, *Galleria mellonella*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 43–51, 2005.

PELEG, A.Y. et al. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n.6, p. 2605–2609, 2009

PEREIRA, M. F. et al. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, v. 161, p. 387–400, 2015.

PHILIPSON, C.W.; BASSAGANYA-RIERA, J.; HONTECILLAS, R. Animal models of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Gut Microbes**, v. 4, n. 4, p. 281–291, 2013.

PRICE, M.F.; WILKINSON, A.N.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouradia**, v. 20, p. 7–14, 1982.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 70, p. 1–7, 2012.



RAMOS, L.; BRANQUINHA, M.; SANTOS, A.L.S. Different classes of hydrolytic enzymes produced by multidrug-resistant yeasts comprising the *Candida haemulonii* complex. **Medical Mycology**, v. 0, n. 0, p. 1-5, 2016.

REEVES, E.P. et al. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia**, v. 158, p. 73–79, 2004.

REGUA-MANGIA, A.H. et al. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Infection**, v. 48, p. 161–167, 2004.

REGUA-MANGIA, A. H. et al. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 414–422, 2009.

ROCHE, J.K. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Impairs Growth while Malnutrition Worsens EAEC Infection: A Novel Murine Model of the Infection Malnutrition Cycle. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 15, p. 506–514, 2010.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J.P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 745-770, 2014.

SARANTUYA, J. et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 1, p.133–139, 2004.

SAVARINO, S.J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Elaborate a Heat-Stable Enterotoxin Demonstrable in an In Vitro Rabbit Intestinal Model. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 1450–1455, 1991.

SCALETSKY, I.C.A et al. Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil : a Case-Control Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 645–648, 2002.

SEARLE, L.J. et al. Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2015.

SHAIK H.A., B; SEHNAL, F. Hemolin expression in the silk glands of *Galleria mellonella* in response to bacterial challenge and prior to cell disintegration. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 781–787, 2009.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALLI'AGNOL, M.; et al. Roles for Fis and Yafk in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 983-997, 2001.

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

SILVA, E.A. *Escherichia coli* enteroagregativa: análise de plasmídios e perfil de resistência e de virulência. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.

SODERHALL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Innate Immunity**, v. 10, p. 23–28, 1998.

SPANO L.C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with and without acute diarrhoea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, p. 359-363, 2008.

SPANO, L. C.; FONSECA, K.; MONFARDINI, M. V. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 1–9, 2017.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891–899, 2007.

SUZART, S. et al. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, n. 2, p. 163-168, 2001.

THOMAS, R.J. et al. *Galleria mellonella* as a model system to test the pharmacokinetics and efficacy of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 4, p. 330–336, 2013.

TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p. 320–329, 2010.

TORRES, A.G.; PAYNE, S.M. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 825–833, 1997.  
TSAI, C.J; LOH, J.M.S; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016.

TZIPORI, S. et al. Studies with Enteroaggregative *Escherichia coli* in the Gnotobiotic Piglet Gastroenteritis Model. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 12, p. 5302–5306, 1992.

UBER, A.P. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, p. 251–257, 2006.

VAN HOUTT, R. et al. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 177–184, 2004.

VIAL, P.A, et al. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **Journal Infection Diseases**, v.158, n,1, p.70-79, 1988.

VIMONT, S., MNIF, B., FEVRE, C., Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1308–1310, 2008.

WILLIAMSON, D.A. et al. *In vivo* correlates of molecularly inferred virulence among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in the wax moth *Galleria mellonella* model system. **Virulence**, v. 5, n. 3, p. 388–393, 2014.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health statistics. Press, Geneva, Switzerland, 2012.

**ANEXO 1 – Perfil de genes de virulência das 73 amostras de EAEC analisadas (MONFARDINI, 2012).**

tEAEC	Gene (n)	<i>aggR</i>	<i>aggA</i>	<i>aafA</i>	<i>agg3A</i>	<i>hdaA</i>	<i>aap</i>	<i>shf</i>	<i>astA</i>	<i>pet</i>	<i>set1A</i>	<i>hlyA</i>	<i>sen</i>	<i>sat</i>	<i>irp2</i>	<i>iucA</i>	<i>chuA</i>	<i>agn43</i>
98 A	5	■					■		■	■						■		
146 A	8	■							■	■	■				■	■		■
164 A	8	■			■			■	■		■				■	■		
Q028 B	6	■			■				■	■	■				■	■		
Q154 A	8	■	■						■	■	■				■	■		■
Q226A	8	■							■	■	■				■	■		■
Q255 D	9	■		■		■	■		■	■	■				■	■		■
Q266 B	7	■				■		■		■	■				■	■		■
Q268 A	8	■				■			■	■	■				■	■		■
Q269 D	7	■				■			■	■	■				■	■		■
Q287 A	10	■							■	■	■	■			■	■		■
Q304 A	8	■			■				■	■	■				■	■		■
Q320 A	8	■					■		■	■	■				■	■		■
Q323 A	8	■					■		■	■	■				■	■		■
Q340 A	7	■						■		■	■				■	■		■
Q345 F	9	■				■			■	■	■				■	■		■
Q370 A	7	■				■		■		■	■				■	■		■
Q391 B	9	■				■			■	■	■	■			■	■		■
Q421 A	6	■					■	■		■	■				■	■		■
Q426 A	7	■					■		■	■	■				■	■		■
Q434 A	10	■				■			■	■	■				■	■		■
Q436 B	7	■							■	■	■				■	■		■

aEAEC	Gene (n)	<i>aggR</i>	<i>aggA</i>	<i>aafA</i>	<i>agg3A</i>	<i>hdaA</i>	<i>aap</i>	<i>shf</i>	<i>astA</i>	<i>pet</i>	<i>set1A</i>	<i>hlyA</i>	<i>sen</i>	<i>sat</i>	<i>irp2</i>	<i>iucA</i>	<i>chuA</i>	<i>agn43</i>
39 B	2								■									■
62 B	2														■			■
89 A	1								■									
102 B	0																	
104 A	2									■						■		
110 C	0																	
133 A	1														■			
140 A	2							■										■
142 E	5								■						■	■	■	■
150 B	2							■										■
155 E	0																	
Q010 A	0																	
Q015 B	5							■	■	■	■					■		
Q016 B	0																	
Q024 A	3								■							■		■
Q087 A	2														■			■
Q110 A	0																	
Q114 A	2								■							■		
Q132 C	0																	
Q158 A	1								■									
Q165 A	1															■		
Q181 A	3								■							■	■	■
Q185 E	5								■						■	■	■	■
Q187 B	5							■		■					■	■	■	■
Q193 A	3							■	■						■			
Q212 D	2									■						■		
Q246 C	0																	
Q265 C	3					■			■							■		
Q280 C	4							■		■					■	■		
Q285 A	1															■		
Q286 D	2														■	■		
Q289 A	2														■	■		
Q300 A	4							■							■	■		■
Q311A	3								■							■	■	
Q318 A	2								■						■			
Q355 A	3									■								■
Q356 B	3									■								■
Q379 B	1								■									
Q385 B	1									■								
Q399 A	3									■					■	■		
Q416 A	3								■									■
Q419 B	3								■						■	■		
Q428 A	2								■							■		
Q433 F	3														■	■		■
Q437 A	4					■				■						■	■	
Q440 A	1															■		

aEAEC	Gene (n)	<i>aggR</i>	<i>aggA</i>	<i>aafA</i>	<i>agg3A</i>	<i>hdaA</i>	<i>aap</i>	<i>shf</i>	<i>astA</i>	<i>pet</i>	<i>set1A</i>	<i>hlyA</i>	<i>sen</i>	<i>sat</i>	<i>irp2</i>	<i>iucA</i>	<i>chuA</i>	<i>agn43</i>
Q445 C	0																	
Q455 A	5							■		■					■	■	■	
Q470 C	2								■							■		
Q488 B	1															■		
Q494 D	3								■						■			■

**ANEXO 2 – Composição dos meios utilizados para detecção de enzimas hidrolíticas.**

- Fosfolipase: glicose 20g/L, extrato de levedura 5 g/L, peptona 10 g/L, NaCl 40 g/L  $\text{CaCl}_2$  0,74 g/L, ágar bacteriológico 15 g/L, 2% (p/v) de gema de ovo);
- Protease - meio ágar leite desnatado: triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, ágar bacteriológico 12 g/L + 5% (p/v) de ágar leite;
- Esterase: peptona 10 g/L, NaCl 5 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 g/L, ágar bacteriológico 15 g/L Tween 80 10 mL/L;
- Hemolisina: ágar sangue 5% de hemácia de carneiro – Merckoplate®.

**ANEXO 3** – Artigo a ser submetido à revista *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*

**Wide heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from several rural communities**

GUERRIERI, C.G.<sup>1</sup>; MONFARDINI, M.V.<sup>2</sup>; SILVA, E.A.<sup>1</sup>; SCHUENCK, R.P.<sup>1</sup>; SPANO, L.C.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

**ABSTRACT**

**Background/Purpose(s):** Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains, widely known as heterogeneous pathogens, have been highlighted as an emerging cause of acute and persistent diarrhea. They are classified as typical and atypical based on the presence or absence of the AggR regulon, respectively. The frequency of the several putative virulence factors is very variable in EAEC isolates, characterizing the great heterogeneity of the pathotype. We aimed to investigate whether the semi-isolated geographical areas whose population has restricted contact with urban area, impacts in the heterogeneity or dissemination of the different strains EAEC.

**Methods:** We analyzed 73 EAEC strains obtained from stool samples of children, with (n = 15) and without diarrhea (n = 58), living in 22 rural “quilombola” communities. All the 73 isolates were analyzed for the presence of 20 putative virulence factors by PCR, plasmid profile, biofilm formation, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and ten isolates were analyzed by multilocus sequence typing (MLST).

**Results:** Twenty two and 51 strains were classified as typical and atypical, respectively. The genes *agg3A*, *hdaA*, *aap*, *shf*, *set1A*, *astA*, *pet*, and *agn43* were statistically associated with typical EAEC. Plasmids were detected in 48% of the isolates and no strains showed the same plasmid profile. Thirty-two isolates were biofilm producers, being 81.8% typical (18/22) and 27.5% atypical (14/51). The 73 isolates showed a total of 58 different pulsotypes and some strains belonging to the same pulsotypes were found in distant communities. The strains analyzed by the MLST showed different PFGE pattern, virulence gene profile, and ST, belonging to ST144, ST200, ST453, ST443, ST730, ST1178, ST2481, ST1286, ST452, ST40.



**Conclusion:** The fact that the communities are semi-isolated did not impact on the peculiar heterogeneity of the EAEC, being characterized as epidemiologically independent strains.

**Keywords:** EAEC, heterogeneity, MLST, PFGE, semi-isolate communities.

## INTRODUCTION

Diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC) are one of the most important causes of infectious diarrhea especially in developing countries.<sup>1</sup> According to clinical manifestations and virulence characteristics acquired by mobile genetic elements due to the genetic plasticity of *E. coli*, six DEC pathotypes were described: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC).<sup>2</sup>

EAEC strains, widely known as heterogeneous pathogens, have been highlighted as an emerging cause of acute and persistent diarrhea in people of all ages in different regions of the world.<sup>3,4,5</sup> This pathotype is identified by ability to produce in culture epithelial cells "stacked brick" arrangement on both epithelial cell surface and cell-free coverslip, which was termed "aggregative adherence" (AA) and does not carry genetic markers of other DEC pathotypes.<sup>6</sup>

High molecular weight plasmids AA (pAA), described in the first EAEC isolates, harbor the genes responsible for a number of virulence factors including: (i) aggregative adherence fimbriae (AAF I - V),<sup>8,9,10,11,12</sup> (ii) the dispersin protein, encoded by the *aap* gene, which favors the dispersion of EAEC by the intestinal surface;<sup>13</sup> (iii) the transcriptional regulator AggR;<sup>14,15</sup> (iv) toxins, such as plasmid encoded toxin (Pet)<sup>16</sup> and EAEC heat-stable enterotoxin (EAST1).<sup>17</sup> Others virulence genes are present on the EAEC chromosome, including the protein involved in intestinal colonization (Pic)<sup>18</sup>, *Shigella* enterotoxin 1 (ShET1)<sup>19</sup> and the iron acquisition genes *irp2* e *chuA*.<sup>20</sup> It is noteworthy that the frequency of these virulence factors is very variable in EAEC isolates from different geographic areas and none of these were restricted to symptomatic patients, which account for the great heterogeneity of the pathotype.<sup>21,22,23</sup> Besides that but also not always observed

among all isolates, is the capacity of biofilm formation, one of the main features of EAEC pathogenesis.<sup>24</sup>

Based on the presence or absence of the AggR regulon, EAEC strains are classified as typical (tEAEC) and atypical (aEAEC), respectively, which regulates a number of virulence genes, including genes present in pAA and chromosomal genes.<sup>7</sup>

As several other pathogens, local or global epidemiological studies of the diversity of *E. coli* strains have been conducted with molecular typing tools as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST).<sup>25,26,27,28</sup> In the *E. coli* MLST database ([http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains)) information about 71,787 strains were registered, among these 556 are classified as EAEC, but most of the available data refers to isolates from Europe, Asia and Africa. Actually, little is known about which sequence types (ST) are found in South America, including in Brazil ([http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains)).

We are not yet aware if the wide heterogeneity of EAEC will be maintained among isolates of individuals living in a semi-isolated geographical area. Therefore, we investigated isolates from children living in rural communities in the north of Espírito Santo, Southeastern Brazil, with restricted contact with urban area, in order to explore whether there will be an impact in the heterogeneity or dissemination of the different strains EAEC, by analyzing the diversity of virulence genes, plasmid profile, PFGE and MLST.

## **METHODS**

### **Characteristics of the geographical area and study population**

Stool samples were obtained from children living in 22 semi-isolated “quilombolas” communities, located in rural areas surrounded by cane fields and eucalyptus trees in the north of the Espírito Santo, southeastern Brazil. These communities were constituted before the twentieth century and are composed of descendants of enslaved Africans, who maintain cultural, subsistence and religious traditions throughout the centuries in Brazilian territory. They are relatively distant from the urban centers of their municipalities, being the nearest community located 20 km

from the center and from each other by a distance ranging from 10 to 30 km on unpaved roads. These low socioeconomic status communities are predominately agricultural, and the population lives in slum conditions, with restricted access to potable water or sewage facilities.

### **Bacterial Strains**

We analyzed 73 EAEC strains obtained from stool samples of “quilombola” children up to 11 years of age, with (n = 15) and without diarrhea (n = 58), during a previous epidemiological study of our lab.<sup>29</sup> All strains were previously characterized as EAEC by the antiaggregation protein transporter gene probe (*aatA*, previously referred to as CVD432 or the AA probe) in colony hybridization assay and expression of the AA pattern in HEp-2 cell culture; typical and atypical EAEC were classified according to the presence or absence of *aggR*, respectively.<sup>29</sup> Bacterial cultures were kept at -20°C in sucrose solution 24%. The study was approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Espírito Santo, Brazil. Stool samples were obtained with the written informed consent from the parents or guardians of the children.

### **Detection of virulence genes by Polymerase Chain Reaction (PCR)**

All the 73 EAEC isolates were screened for the presence of 20 putative virulence factors by PCR, for which the target genes, sequences of primers, sizes of the amplicons, control strains and PCR conditions are described at Table 1. A DNA template was prepared by boiling a suspension of 1 colony in 50 µL distilled water.

All the reactions were carried out in a final volume of 25 µL with 5 µL of extracted DNA (10 ng/µL), reaction buffer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP, 0.02 U/µL of DNA Taq polymerase<sup>TM</sup> (Invitrogen, Brazil) and 0.4 µM of each primer. The only exception was for *set1A*, *astA* and *pet* primers which were used in a concentration of 0.16 µM in a multiplex reaction. Amplifications were performed in Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Gene	Encoded protein	Primer pair (5' - 3')	PCR conditions	Control Strain	Amplicon size (pb)	Reference
<i>aggA</i>	AAF/I fimbrial subunit	TTAGTCTTCTATCTAGGG/ AAATTAATTCCGGCATGG	95°C/5min, 30x (94°C/1min; 46°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min	EAEC 17-2	450	21 This study
<i>aafA</i>	Fimbrial subunit of AAF/II	ATGTATTTTTAGAGGTTGAC/ TATTATATTGTCACAAGCTC	95°C/5min, 30x (94°C/1min; 50°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min	EAEC 042	518	21 This study
<i>agg-3A</i>	Fimbrial subunit of AAF/III	GTATCATTGCGAGTCTGGTATTCAG/ GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG	95°C/5min, 30x (94°C/1min; 65°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min	<i>E. coli</i> RN785-1	462	8 This study
<i>aggR</i>	AAF/I and AAF/II transcriptional activator	CTAATTGTACAATCGATGTA/ ATGAAGTAATTCTTGAAT	95°C/5min, 30x (94°C/1min; 42°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min	EAEC 042	308	21
<i>aap</i>	Antiaggregation protein (dispersin)	CTTTTCTGGCATCTTGGGT/ GTAACAACCCCTTTGGAAGT	95°C/5min, 30x(94°C/1min; 52°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min	EAEC 042	232	21
<i>shf</i>	Cryptic ORF	ACTTTCTCCCGAGACATTC/ CTTTAGCGGGAGCATTTCAT	95°C/5min, 30x(94°C/1min; 50°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min	EAEC 042	613	21
<i>hlyA</i>	α-haemolysin	CTCATTGGCCTCACCGAACGG/ GCTGGCAGCTGTGTCCACGAG	95°C/5min, 35x(94°C/30sec; 57°C/30sec; 72°C/1min), 72°C/7min	Personal collection	299	30
<i>irp2</i>	Yersiniabactin biosynthetic gene	AAGGATTGCTGTTACCGGAC/ TCGTGCGGCAGCGTTTCTTCT	95°C/5min, 30x(94°C/1min; 55°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min	<i>E. coli</i> RN785-1	264	21
<i>yafK</i>	Required for the transcription of AAF/II genes	ATTCTAGAAACCGTTTTATCAAG/ ATAAGCTTTGGCGCTTATTTTGC	95°C/5min, 35x(94°C/1min; 52°C/45sec; 72°C/1min), 72°C/7min	EAEC 042	800	31 This study
<i>sen</i>	<i>Shigella</i> enterotoxin 2	ATGTGCCTGCTATTATTTAT/ CATAATAATAAGCGGTCAGC	95°C/5min, 30x(94°C/1min; 55°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min	Personal collection	799	32
<i>agn43</i>	Antigen 43	ACGCACAACCATCAATAAAA/ CCGCCTCCGATACTGAATGC	95°C/5min, 30x(94°C/1min; 52°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min	EAEC 042	600	22

<i>sat</i>	Autotransporter toxin	ACTGGCGGACTCATGCTGT/ AACCTGTAAAGAAGACTGAGC	95°C/5min, 30x(94°C/25sec; 64°C/1min; 72°C/2,5min), 72°C/7min	<i>Shigella flexineri</i> MA245-5	387	33
<i>fis</i>	Transcriptional regulator	ATGCCGTATTTTTTCAATTTTTTAC/ ATGTTCTGAACAACGCGTAAATTCT	94°C/10min, 25x(94°C/30sec; 58°C/40sec; 72°C/55sec), 72°C/10min	EAEC 042	297	31
<i>astA</i>	EAEC heat-stable enterotoxin 1	CCATCAACACAGTATATCCGA/ GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	95°C/5min, 30x(94°C/1min; 55°C/1min; 72°C/1min), 72°C/7min*	EAEC 042	111	34
<i>pet</i>	Plasmid encoded toxin	GACCATGACCTATACCGACAGC/ CCGATTTCTCAAACCTCAAGACC		EAEC 042	600	
<i>set1A</i>	<i>Shigella</i> enterotoxin 1	TCACGCTACCATCAAAGA/ TATCCCCCTTTGGTGGTA		EAEC 042	309	
<i>chuA</i>	<i>E. coli</i> haem utilization gene	ATCTGCTGCGTCATGTTTCCT/ GTAGTGGTCATACCTTTGAGC	95°C/5min, 30x(94°C/30sec; 52°C/30sec; 72°C/1,5min), 72°C/7min*	<i>E. coli</i> EDL933	1700	35
<i>iucA</i>	Aerobactin siderophore	AGTCTGCATCTTAACCTTCA / CTCGTTATGATCGTTCAGAT		<i>Shigella flexineri</i> MA245-5	1100	
<i>papC</i>	P fimbriae	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG/ ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	95°C/5min, 30x(94°C/2min; 65°C/1min; 72°C/2min), 72°C/7min*	<i>E. coli</i> J96	328	36
<i>sfa</i>	S fimbriae	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC/ CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA			410	

Table 1: Primers, sizes of the amplicons, control strains and PCR conditions to virulence genes detection.

\* Multiplex PCR

## **Plasmid profiles**

Extraction of the plasmid DNA was performed using the kit HiPurA™ Plasmid DNA Miniprep Purification Kit (Qiagen™), according to the manufacturer's instructions. The extracted plasmids were analyzed after agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide. *E. coli* (36R861) was used as plasmid standard.

## **Biofilm formation assay**

The assay for biofilm detection and quantification was performed on 96-well polystyrene microplates according to the protocol described by Sheikh et al. (2001), except for the crystal violet biofilm staining, which was then detected by optical density (OD) with Thermoplate TP-READER® at a wavelength of 570 nm. The classification of the bacterial into a biofilm "producer" or "non-producer" and "strong producer" or "weak producer" was performed according to Stepanovic et al. (2007).

## **Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)**

All the 73 isolates were analyzed according to Durmaz et al. (2009) to investigate their clonal relationships. PFGE was performed after macrorestriction with *Xba*I in a CHEF-DRIII system (Bio-Rad, USA), and analyzed with the software *GeIJ*<sup>39</sup> using the unweighted pair-group method with the arithmetic mean (UPGMA) applying the Dice correlation coefficient. Isolates were considered as the same pulsotype if they shared at least an 80% similarity in the band patterns.

## **Multilocus Sequence Typing (MLST)**

Ten isolates were randomly selected for the MLST analysis. The MLST were performed as the recommendations described in the *E. coli* MLST database ([http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains)).<sup>27</sup>

## **Statistical Analysis**

The association between virulence genes, biofilm production and typical or atypical EAEC strains was analysed by  $\chi^2$  and Fisher's exact tests using the SPSS v. 17.0 software. A P- value < 0.05 was considered significant.

## RESULTS

### Detection of virulence genes by Polymerase Chain Reaction (PCR)

The *aggR* classified 22 and 51 strains as typical and atypical EAEC, respectively. Among strains obtained from symptomatic children, 10 (66.7%) were atypical EAEC and 5 (33.3%), typical EAEC. Among strains obtained from asymptomatic children, 41 (70.7%) were atypical EAEC and 17 (29.3%), typical EAEC. The genes *agg3A*, *hdaA*, *aap*, *shf*, *set1A*, *astA*, *pet*, and *agn43* were statistically associated with typical EAEC when compared to atypical EAEC strains ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

Virulence genes	Typical EAEC N = 22 n (%)	Atypical EAEC N = 51 n (%)	Total N = 73 n (%)	<i>p</i> value
<i>aggR</i>	22 (100.0)	0 (0.0)	22 (30.1)	< 0.05
<i>aggA</i>	1 (4.5)	0 (0.0)	1 (1.4)	ND
<i>aafA</i>	1 (4.5)	0 (0.0)	1 (1.4)	ND
<i>agg3A</i>	3 (13.6)	0 (0.0)	3 (4.1)	< 0.05
<i>hdaA</i>	9 (40.9)	1 (2.0)	10 (13.7)	< 0.05
<i>aap</i>	19 (86.4)	0 (0.0)	19 (26.0)	< 0.05
<i>shf</i>	11 (50.0)	8 (15.7)	19 (26.0)	< 0.05
<i>astA</i>	12 (54.5)	13 (25.5)	25 (34.2)	< 0.05
<i>pet</i>	20 (90.9)	15 (29.4)	35 (48.0)	< 0.05
<i>set1A</i>	20 (90.9)	1 (2.0)	21 (28.8)	< 0.05
<i>hlyA</i>	2 (9.1)	1 (2.0)	3 (4.1)	ND
<i>sen</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	ND
<i>sat</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	ND
<i>irp2</i>	13 (59.1)	20 (39.2)	33 (45.2)	> 0.05
<i>iucA</i>	14 (63.6)	25 (49.0)	39 (53.4)	> 0.05
<i>chuA</i>	6 (27.3)	6 (11.8)	12 (16.4)	> 0.05
<i>agn43</i>	13 (59.1)	15 (29.4)	28 (38.4)	< 0.05
<i>papC</i>	1 (4.5)	1 (2.0)	2 (2.7)	ND
<i>sfa</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	ND
<i>yafK</i>	20 (90.9)	47 (92.2)	67 (91.8)	> 0.05
<i>fis</i>	22 (100.0)	51 (100.0)	73 (100.0)	ND

Table 2: Distribution of virulence genes between typical and atypical EAEC strains. ND: not determined.

The genes *sen*, *sat* and *sfa* were not found in any EAEC isolates analyzed. None of the others genes had a significant association with isolates from symptomatic children ( $p>0.05$ ) (data not shown).

The gene set ranged from 6 to 11 among typical EAEC strain (mean= 8.5 genes/strain) and from 0 to 7 among atypical EAEC strains (mean=3 genes/strain), excluding the *fis* gene that was observed in all isolates. From among typical EAEC strains, 59.1% (13/22) had 8 to 9 genes, while 78.4% of the atypical EAEC (40/51) had 1 to 4 genes.

### Plasmid profiles

Plasmids were detected in 48% of the EAEC isolates. The atypical EAEC showed up to seven plasmids per isolate, while the typical EAEC up to five, and only these showed plasmids with higher molecular weights (>60 MDa). A higher diversity of low molecular weight plasmids was observed in atypical EAEC (Data not shown). No strains showed the same plasmid profile (Figure 1).

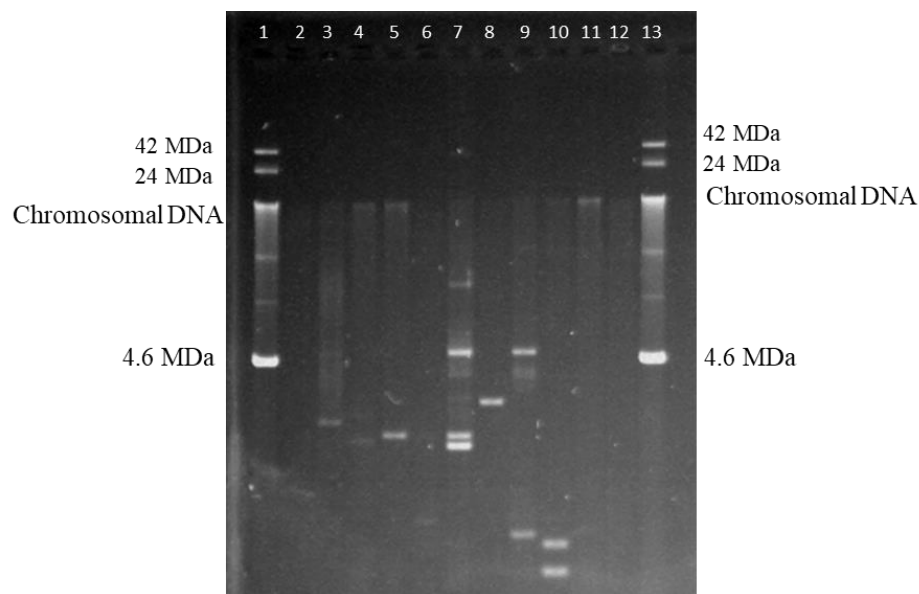


Figure 1: Plasmids extracted from EAEC samples. Lanes: 1, 13: DNA Ladder strain 39R861; 2: strain 20A; 3: strain 139 D; 4: strain 010A; 5: strain 016B; 6: strain 165A; 7: strain 181A; 8: strain 185E; 9: strain 187B; 10: strain 300A; 11: strain 311A; 12: strain 322Ab.

### Biofilm formation assay

Of the 73 EAEC isolates, 32 were biofilm producers, being 81.8% typical (18/22) and 27.5% atypical (14/51) ( $p<0.05$ ). Only the isolates of typical EAEC were able to produce strong biofilm (data not shown).



## PFGE

PFGE dendrogram showed a total of 58 different pulsotypes with the correspondent set of genes, most of these (75.9% - 44/58) consisted of only one sample, 22.4% (13/58) were composed of two samples and only 1.7% (1/58) consisted of three samples (Figure 2). The PFGE analysis revealed a high clonal heterogeneity with a Dice similarity index ranging from 6 to 100%.

It was observed that, of the 14 groups of samples of the same pulsotype (13 composed of two samples each and one composed of three samples), seven were composed of samples from the same community and seven from distant communities.

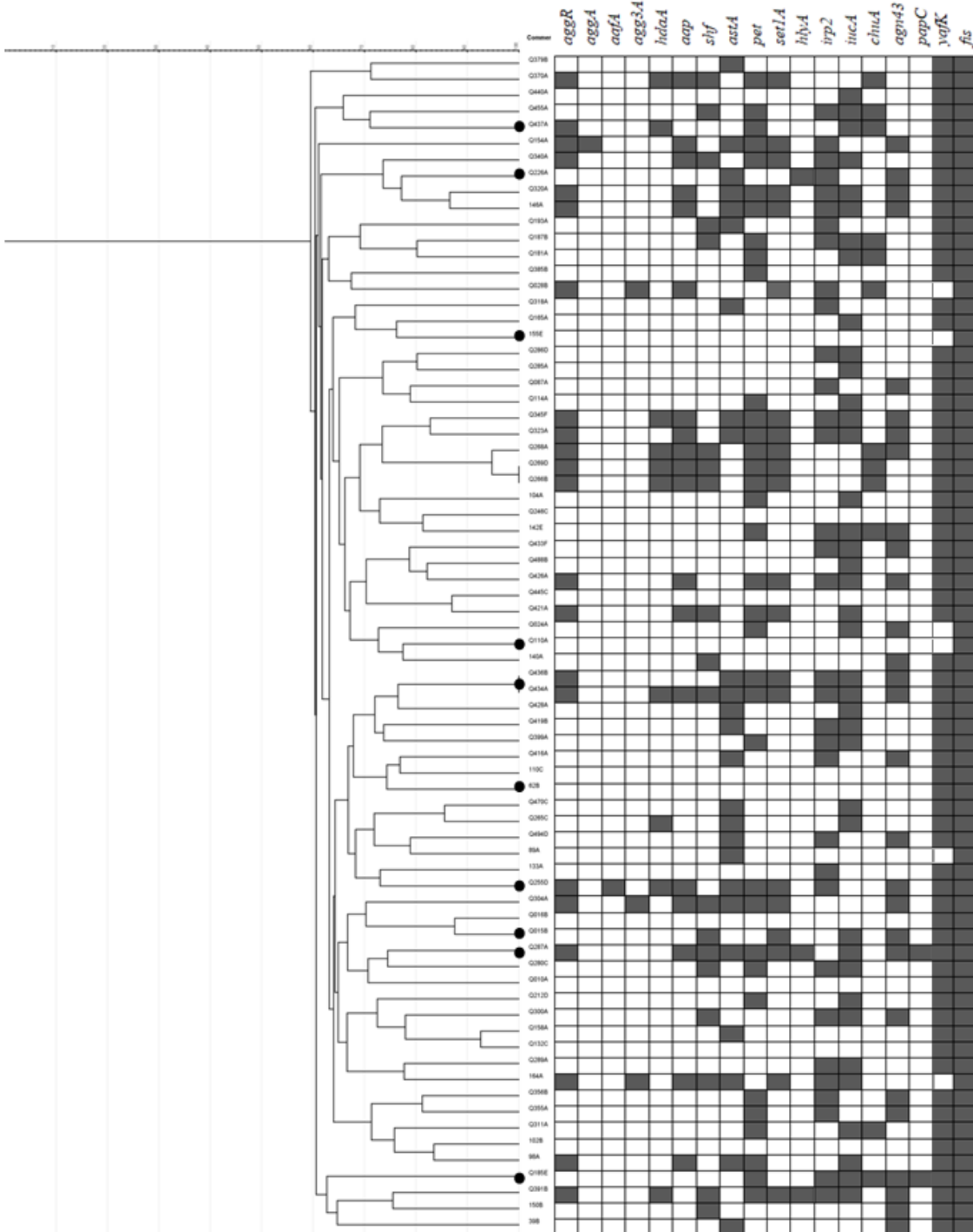
Only two groups consisted of samples with the same repertoire of virulence genes. Therefore, no relationship was observed between the virulence gene profile, the pulsotype and the community of origin for most samples except for two groups.

(a)



(b)

Fig.2. (a) PFGE profiles of EAEC strains after macrorestriction with *Xba*I Lanes: 1, 15: lambda DNA



ladder ranging from 48.5 to 727.5 kb; 2: strain Q399A; 3: strain Q416A; 4: strain Q419B; 5: strain Q421A; 6: strain Q426A; 7: strain Q428A; 8: strain Q433F; 9: strain Q434A; 10: strain Q436B; 11: strain Q437A; 12: strain Q440A; 13: strain Q445C; 14: strain Q455A. (b) Dendrogram of PFGE profiles generated by the software GelJ using the Dice coefficient and clustering by UPGMA with correspondent genes profile. ●Strains randomly selected for MLST analysis.

## MLST

The strains selected for the MLST analysis showed different PFGE pattern, with less than 75% of similarity, and different virulence gene profile (Fig 1). Furthermore, the isolates belonged to different ST, except for two strains which were from a same clonal complex – CC40 (Table 3).

Strain	Pulsotype	ST	CC	Allelic profile						
				<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>
Q185E	A	144	nd	13	43	9	36	30	44	25
Q255D	B	200	40	6	4	5	26	7	8	14
62B	C	453	86	99	6	33	33	24	8	7
Q287A	D	443	205	6	19	15	16	9	8	7
Q226A	E	730	nd	8	7	1	1	8	18	6
Q015B	F	1178	nd	10	27	5	8	12	1	2
Q110A	G	2481	nd	6	11	4	8	42	8	2
155E	H	1286	nd	10	174	4	8	8	8	2
Q437A	I	452	nd	76	43	19	37	30	1	25
Q434A	J	40	40	6	4	5	26	20	8	14

Table 3: MLST analysis of 10 EAEC strains. ST: sequence type; CC: clonal complex; nd: not described.

## DISCUSSION

The genotypic and phenotypic aspects of virulence of EAEC that we investigate in this study showed the high diversity present among the isolates revealing that the characteristically heterogeneous nature of the pathotype remains even when isolated from children living in rural semi-isolated communities. In general, the distribution of genes analyzed between isolates of typical and atypical strains and between symptomatic and asymptomatic cases followed previously described results, as discussed below.

Altogether, the genes *aggA*, *aafA*, *agg-3A*, *pap* and *sfa* that encodes the fimbrial subunits AAF/I, AAF/II, AAF/III and P and S-fimbria, respectively, were observed in a very low frequency or was absent (*sfa*), similar to the rates described for these genes in Brazil and other countries.<sup>26,34,40,41,42</sup> Therefore, these results suggest that other untested or even unknown adhesins may be involved in the early stage of EAEC pathogenesis.

The *aap* gene, encoding the dispersin protein, was detected at a total frequency of 26% of EAEC isolates. Rates of 8.4% to 32.6% were found in other studies with travelers to developing countries (Mexico, Jamaica and India), in individuals with and without diarrhea in Nigeria and Mongolia or in children (<5 years) with diarrhea in Tanzania.<sup>22,23,34,42,43,44</sup> Although it is a gene related to the virulence of EAEC because it gives an antiaggregation phenotype that allows its dispersion in the mucosa, the results obtained in the present study did not show a significant difference between the isolates of individuals with and without diarrhea ( $p > 0.05$ ).

The *pet* gene was the most frequent (48%) encoding toxin gene among those investigated (*astA*, *set1A*, *sen*, *sat* e *hlyA*). Although gene encodes a protein that cleaves and degrades the  $\alpha$ -fodrine, leading to the destruction of the cytoskeleton and consequent cellular exfoliation<sup>45</sup>, it was not statistically significant among isolates of children with diarrhea ( $p > 0.05$ ), as well as the other investigated. A similar frequency for *pet* gene (38%) was described in children from the south, northeast and central-west of Brazil.<sup>46</sup>

The more common gene involved in iron uptake in the present study, *irp2*, is commonly detected at high frequency (47.1% to 94%), in isolates of individuals from different parts of the world.<sup>21,34,41,47,48,49</sup> Similarly, no association of the *irp2* gene with isolates from children with diarrhea were observed by our and other studies.<sup>34,40,46,48</sup>

The *agn43* gene, related to biofilm formation, was found at a similar rate to those described by Mendez-Arancibia et al. (2008) in EAEC samples from children under five with diarrhea in Tanzania (38.4% versus 33.7%). No studies conducted in Brazil have investigated this gene in EAEC samples.

The *fis* and *yafK* genes were found at very high frequencies in the analyzed EAEC strains and showed a homogeneous distribution between typical EAEC and atypical EAEC. Both genes were described as important in the biofilm formation of EAEC 042 by mediating the expression of AAF/II.<sup>31</sup> However, in the present study the frequency of the fimbrial subunit of AAF/II was extremely low (1.37%) and the *fis* and *yafK* gene was high, so it is not possible to correlate this gene with biofilm formation in this isolates.

Studies carried out with isolates of children (India, Tanzania and Denmark) and travelers from developed countries to Mexico, India and Guatemala described biofilm formation rates higher than those found in the present study, ranging from 53% to 84.6%.<sup>9,22,48,50</sup> These differences can be explained by the origin of the studied population, by the technique used for detection and by the way of classification of biofilm producers. Although biofilm formation is one of the important steps attributed to the pathogenesis of diarrhea by EAEC, it was not statistically associated with the isolates of symptomatic children ( $p>0.05$ ). Biofilm formation was statistically associated with the presence of the *aggR* gene, because, among the genes controlled by the AggR regulon, there are the genes that modulate biofilm formation.<sup>22,48,51</sup>

As a reflection of the diversity of gene sets observed among the isolates and similar to studies that used PFGE to analyze the molecular epidemiology of EAEC isolates<sup>26,41,52</sup>, the present study demonstrated a wide diversity of fragmentation patterns. In addition, a wide variety of plasmid profiles was revealed among typical and atypical EAEC. Taking into account that many of the virulence genes investigated are plasmid-borne, these genes can be transferred horizontally between EAEC strains, generating the great genetic heterogeneity observed.<sup>21</sup> In addition, due to the high genetic plasticity of *E. coli*, EAEC isolates may also acquire other mobile genetic elements, encoding virulence factors, such as that occurred in the Germany outbreak of EAEC producing Stx toxin in 2011, which contributes even more to its heterogeneity and emergence of possible new pathotypes.<sup>53</sup> Therefore, except for two groups that came from the same or neighboring communities, no relationship was observed among pulsotypes, the virulence gene profile and the community of origin for the most groups.

Although the MLST has recently been used for molecular typing of pathogenic strains of *E. coli*<sup>25,54</sup>, there is a lack of information concerning the distribution of EAEC STs in Brazil, preventing analysis of global relationship of this pathotype. In the present study, we detected the presence of ten distinct STs, and only two strains belonging to the same clonal complex (ST40cplx which comprises the ST40 and the ST200). The STs 40, 144, 200 and 453 have been described for EAEC in other countries, including Italy (ST40), United Kingdom (ST40/ST200 – ST40cplx), Thailand (ST40/ST200 – ST40cplx), Bangladesh (ST200) and Nigeria (ST144 and ST453)

([http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search\\_strains](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/search_strains)). The remaining STs (ST443, ST730, ST1178, ST1286 and ST2481) were described only for other *E. coli* pathotypes, therefore this study comprises the first report of these STs in EAEC.

The diversity of STs observed in a unique and single epidemiological strain set confirms the great heterogeneity of EAEC even in strains from semi-isolated rural communities, with restricted contact with urban centers. Moreover, the isolates belonging to different STs, suggests that these strains represent distinct evolutionary lineages, corroborating with Okeke et al (2010) which demonstrated that the aggregative adherence pattern was acquired by different *E. coli* lineages by multiple pathways.

Two of the ST (144, 453) found in isolates from quilombola children have already been described in EAEC strains from Nigeria. As the “quilombolas” communities are formed by descendants of slaves and Nigeria was one of the countries of origin of the Brazilian slaves, we can suggest that these EAEC lineages were introduced in these communities in that context. On the other hand, we cannot exclude other sources of acquisition of the bacterial strains because nowadays although the “quilombolas” individuals live in semi-isolated areas, they have already undergone some miscegenation.

In conclusion, the molecular methods used to analyze the clonal relationship among EAEC strains from semi-isolated areas demonstrate that most of them do not present genotypic relationship. The isolates were characterized as epidemiologically independent strains, given the great difference in fragmentation patterns, in the plasmid profiles and in virulence genes sets. Furthermore, the isolates analyzed by the MLST belong to different STs, suggesting that these strains represent distinct evolutionary lineages.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Dr Isabel Cristina Affonso Scaletsky for kindly giving us the *E. coli* (36R861) strain for the detection of plasmids.

Financial support was provided by FAPES (Fundação de amparo à pesquisa do Espírito Santo).

## REFERENCES

1. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26:822-880.
2. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11:142-201.
3. Amaya E, Reyes D, Vilchez S, Paniagua M, Mollby R, Nord CE et al. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. *Journal of Medical Microbiology* 2011; 60:216-222.
4. Huppertz HI, Rutkowski S, Aleksic S, Karch H. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. *The Lancet* 1997; 349:1660–62.
5. Okhuysen PC, DuPont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance. *The Journal of Infectious Diseases* 2010; 202:503–505.
6. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric infectious disease journal* 1987; 6:829-831.
7. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiology Letters* 2006; 254:12-18.
8. Bernier C, Pierre G, Le Bouguéne 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* 2002; 70:4302–4311.
9. Boisen N, Carsten S, Flemming S, Krogfelt KA, Nataro JP. New Adhesin of Enteroaggregative *Escherichia coli* Related to the Afa/Dr/AAF Family. *Infection and Immunity* 2008; 76:3281–3292.
10. Czczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH et al. Aggregative Adherence Fimbria II, a Second Fimbrial Antigen Mediating Aggregative Adherence in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1997; 65:4135–4145.
11. Jønsson R, Struve C, Boisen N, Mateiu V, Santiago AE, Jenssen H et al. Novel Aggregative Adherence Fimbria Variant of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 2015; 83:1396-1405.
12. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM. Aggregative Adherence Fimbriae I of Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediate Adherence to HEp-2 Cells and Hemagglutination of Human Erythrocytes. *Infection and Immunity* 1992; 60:2297-2304.

13. Sheikh J, Czeczulin JR, Harrington S, Hicks S, Henderson IR, Le Bouguéneq, C, et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Journal of Clinical Investigation* 2002; 110:1329-1337.
14. Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 2006; 62:1267-1282.
15. Nataro JP, Yikang D, Yingkang D, Walker K. AggR, a Transcriptional Activator of Aggregative Adherence Fimbria I Expression in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1994; 176: 4691-4699.
16. Navarro-García F, Sears C, Eslava C, Cravioto A, Nataro JP. Cytoskeletal Effects Induced by Pet, the Serine Protease Enterotoxin of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1999; 67:2184-2192.
17. Ménard LP, Dubreuil JD. Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 (EAST1): A New Toxin with an Old Twist. *Critical Reviews in Microbiology* 2002; 28:43-60.
18. Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1999; 67:5587-5596.
19. Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval DR, Guers LD, Noriega F, Dubovsky F, Levine MM, Morris JG. Identification and Cloning of a Novel Plasmid-Encoded Enterotoxin of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* Strains. *Infection and Immunity* 1995; 63:4721-4728.
20. Torres AG, Payne SM. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology* 1997; 23:825-833.
21. Czeczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-garcia F, Nataro JP. Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1999; 67:2692-2699.
22. Mendez-arancibia E, Vargas M, Soto S, Ruiz J, Kahigwa E, Schellenberg D et al. Prevalence of Different Virulence Factors and Biofilm Production in Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates Causing Diarrhea in Children in Ifakara (Tanzania). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2008; 78:985-989.
23. Okeke IN, Lamikanra A, Czeczulin J, Dubovsky F, Kaper JB, Nataro JP. Heterogeneous Virulence of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Children in Southwest Nigeria. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181:252-260.
24. Okeke IN, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Lancet* 2001; 1:304-313.



25. Dallman T, Smith GP, Brien BO, Chattaway MA, Finlay D, Grant KA, Jenkins C. Characterization of a Verocytotoxin-Producing Enteroaggregative *Escherichia coli* Serogroup O111:H21 Strain Associated with a Household Outbreak in Northern Ireland. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50:4116-4119.
26. Regua-mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Irino K, Teixeira LM. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 2009; 58:414-422.
27. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology* 2006; 60:1136-1151.
28. Zhang R, Gu D, Huang Y, Chan EW, Chen G, Chen S. Comparative genetic characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains recovered from clinical and non-clinical settings. *Scientific Reports* 2016; 6:1-9.
29. Lozer DM, Souza TB, Monfardini MV, Vicentini F, Kitagawa SS, Scaletsky ICA et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13:1-6.
30. Guignot J, Breard J, Bernet-camard O, Peiffer I. Pyelonephritogenic Diffusely Adhering *Escherichia coli* EC7372 Harboring Dr-II Adhesin Carries Classical Uropathogenic Virulence Genes and Promotes Cell Lysis and Apoptosis in Polarized Epithelial Caco-2/TC7 Cells. *Infection and Immunity* 2000; 68:7018–7027.
31. Sheikh J, Hicks S, Agnol MD, Phillips AD, Nataro JP. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 2001; 41: 983-997.
32. Vila J, Vargas M, Henderson IR, Gascón J, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. *Journal of infectious diseases* 2000; 182:1780-1783.
33. Ruiz J, Navia MM, Vila J, Gascón J. Prevalence of the Sat gene among clinical isolates of *Shigella* spp. Causing travelers' diarrhea: geographical and specific differences. *Journal of clinical microbiology* 2002; 40:1565-1566.
34. Huang DB, Mohamed JA, Nataro JP, Dupont HL, Jiang Z, Okhuysen PC. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. *Journal of Medical Microbiology* 2007; 56:1386–1392.
35. Okeke IN, Scaletsky ICA, Soars EH, Macfarlane LR, Torres AG. Molecular Epidemiology of the Iron Utilization Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42:36-44.

36. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the pap, afa and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* 1992; 30:1189-1193.
37. Stepanovic S, Vukovic D, Bonaventura GD, Djukic S, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates : overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115:891-899.
38. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The Optimization of a Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for the Typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2009; 62:372-377.
39. Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, et al. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics* 2015; 16:1-8.
40. Elias WP, Uber AP, Tomita SK, Trabulsi LR, Gomes TA. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhea. *Epidemiology and Infection* 2002; 129:49-55.
41. Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, Khanam J, Yamasaki S, Nandy R, et al. Virulence Characteristics and Molecular Epidemiology of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates from Hospitalized Diarrheal Patients in Kolkata , India. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42:4111-4120.
42. Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, Erdene S, Nataro JP, Sheikh J, et al. Typical Enteroaggregative *Escherichia coli* is the Most Prevalent Pathotype among *E. coli* Strains Causing Diarrhea in Mongolian Children. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42:133-139.
43. Jiang ZD, Greenberg D, Nataro JP, Steffen R, Dupont HL. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40:4185-4190.
44. Huang DB, Jiang Z, Dupont HL. Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the united states to Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2003; 69:506-508.
45. Canizales-Roman A, Navarro-Garcia. Fodrin CaM- binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. *Molecular Microbiology* 2003; 48:947-958.
46. Zamboni A, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42:1058-1063.

47. Jenkins C, Chart H, Willshaw GA, Cheasty T. Association of putative pathogenicity genes with adherence characteristics and fimbrial genotypes in typical enteroaggregative *Escherichia coli* from patients with and without diarrhoea in the United Kingdom. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2007; 26:901–906.
48. Mohamed JA, Huang DB, Jiang Z, Dupont HL, Nataro JP, Belkind-gerson J, et al. Association of Putative Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Genes and Biofilm Production in Isolates from Travelers to Developing Countries. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45:121-126.
49. Tokuda K, Nishi J, Imuta,N, Fujiyama R, Kamenosono A, Manago K, et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima , Japan: biofilm formation and acid resistance. *Microbiology and Immunology* 2010; 54:320-329.
50. Bhardwaj R, Majumdar S, Ganguly NK, Taneja N, Dutta S, Ramamurthy T, et al. Characterization of adhesin variants in Indian isolates of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology letters* 2006; 258:274-283.
51. Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Sarantuya J, Iwashita M, et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004; 71:687-690.
52. Adachi JA, Jiang Z, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martinez-sandoval F, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a Major Etiologic Agent in Traveler's Diarrhea in 3 Regions of the World. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32:1706-1709.
53. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, Matthias DH, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The new england journal of medicine original* 2011; 365:1771–1780.
54. Okeke IN, Wallace-gadsden F, Simons HR, Matthews N, Labar AS, Hwang J, et al. Multi-Locus Sequence Typing of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates from Nigerian Children Uncovers Multiple Lineages. *Plos one* 2010; 5:1-12.