

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

LAURA KREUZ FAGUNDES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FORMAÇÃO DE BIOFILME E
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *E. coli* DE
ADERÊNCIA DIFUSA Afa/Dr E NÃO Afa/Dr**

VITÓRIA
2013

LAURA KREUZ FAGUNDES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FORMAÇÃO DE BIOFILME E
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *E. coli* DE
ADERÊNCIA DIFUSA Afa/Dr E NÃO Afa/Dr**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Liliana Cruz Spano

VITÓRIA
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,

Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Fagundes, Laura Kreuz, 1983-

F156c Caracterização molecular, formação de biofilme e susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de E. coli de aderência difusa Afa/Dr e não Afa/Dr / Laura Kreuz Fagundes. – 2013.

84 f. : il.

Orientadora: Liliana Cruz Spano.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Escherichia coli. 2. Biofilme. I. Spano, Liliana Cruz. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU:61



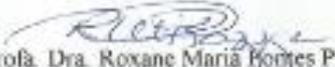
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

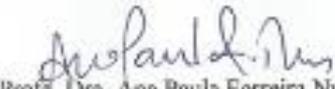
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda LAURA KREUZ FAGUNDES apresentou a dissertação intitulada "CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FORMAÇÃO DE BIOFILME E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *E. coli* DE ADERÊNCIA DIFUSA Ata/Dr E NÃO Ata/Dr" em sessão pública, no dia 26 de agosto de 2013, 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, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica LAURA KREUZ FAGUNDES obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 26 de agosto de 2013


Prof.ª. Dra. Roxane Maria Pontes Piazza
(Membro Externo)


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


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

À Deus, meu Senhor, pela oportunidade de realizar esse trabalho ao lado de excelentes profissionais e por me capacitar frente a todos obstáculos.

Aos meus pais, Clavius e Martha, pelas inúmeras renúncias que garantiram minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, a quem devo todas as honras e méritos pela realização desse trabalho.

À minha orientadora Liliana Cruz Spano, por todos os ensinamentos, pela enorme paciência e pelo exemplo profissional e pessoal.

À Mariane Vedovatti Monfardini, pela amizade, companheirismo e auxílio técnico, de grande importância no decorrer desse trabalho.

Às minhas amigas e companheiras de laboratórios, Marina, Keyla, Yohanna, Lilian, Anazi e Mariana, pela ajuda nos experimentos e pelos inúmeros momentos de alegria.

Às amigas Heloísa, Liamara, Érica e Simone, funcionárias do laboratório de microbiologia, pela disponibilidade em ensinar e contribuir com a pesquisa, e pela grande amizade.

Aos professores da pós-graduação, pelos conhecimentos e experiências transmitidos.

Aos colegas da turma de pós-graduação, pelo apoio e amizade.

À minha família, Clavius, Martha, Matheus, Claudio, Janete, Lauro, Maria Helena, Patricia e Paulo, por todo apoio, paciência e incentivo.

À todos meus amigos, pela compreensão e apoio.

À FAPES, pela bolsa de estudo.

À todos que contribuíram com a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC), um patotipo diarreiogênico de *E. coli*, corresponde a um grupo heterogêneo sem marcador de virulência comum a todos os isolados e de papel controverso na diarreia infantil. O objetivo deste estudo foi caracterizar genotípica e fenotipicamente amostras de DAEC, portadoras e não portadoras de adesinas Afa/Dr, isoladas de crianças com e sem diarreia. Em 70 amostras de DAEC, PCR foi realizado para pesquisa de genes descritos em DAEC, EAEC ou UPEC, que codificam: (i) oito adesinas fimbriais e afimbriais (*fimH*, *papC*, *sfa*, *aggA*, *aafA*, *agg3A*, *aidA/aah*, *afaC*); (ii) cinco toxinas (*pet*, *astA*, *set1A*, *sat*, *hlyA*); (iii) três proteínas captadoras/receptora de ferro (*irp2*, *iucA*, *chuA/shuA*); (iv) invasina (*daaD*) e; antígeno 43 (*agn43*). Ensaio de formação de biofilme foi realizado a partir da bactéria cultivada em caldo Luria-Bertani e inoculada em placas de poliestireno com DMEM suplementado com 0,4% glicose. A leitura da densidade óptica (DO₄₉₀) foi realizada após coloração com safranina. Soroaglutinação para 23 antígenos O (Probac do Brasil) foi realizada em 50% das DAEC. Método de difusão de disco foi realizado para testar a suscetibilidade a 13 antimicrobianos. A presença de pelo menos um gene que codifica adesinas, toxinas, proteínas captadoras/receptora de ferro, invasina ou antígeno 43 foram encontrados em 58,6%, 51,4%, 80%, 48,6% e 57,1%, respectivamente, com os genes *fimH*, *irp2*, *agn43*, *iucA*, *chuA/shuA*, presentes em mais de 50% das amostras. Gene *afaC+* (PCR) e/ou sonda *afaBC+* (hibridização de colônias) classificou 50% das DAEC como Afa/Dr, sendo *pet*, *sat*, *irp2*, *iucA*, *chuA/shuA* e *agn43* significantes nessas amostras ($p < 0,05$). Do total das DAEC, 44,3% foram formadoras de biofilme, igualmente distribuídas entre as Afa/Dr e não Afa/Dr, e nenhum gene foi associado com esse fenótipo. Sorologia de 35 amostras evidenciou os seguintes sorogrupos: 1 O29, 2 O125, 2 O127 e 7 O86. Todas as O86 foram de DAEC Afa/Dr. Maiores frequências de resistência antimicrobiana foram encontradas para ampicilina (55,7%), sulfametoxazol/trimetoprim (35,7%) e tetraciclina (28,6%) e o perfil resistente/intermediário para amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim foi significativa nas DAEC Afa/Dr, assim como a multi-droga resistência ($p < 0,05$). Em conclusão, observou-se: (i) alta frequência de *fimH* e *pet* e presença de *agn43*, até então não descrito em DAEC, em frequências similares àquelas encontradas em EAEC, UPEC e EAEC/UPEC, respectivamente; (ii) que as amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr constituíram grupos com perfis genéticos diferenciados entre si; (iii) poucos sorogrupos foram encontrados entre as DAEC; (iv) frequências de resistência menores quando comparado com as poucas descrições em DAEC, sugerindo uma menor pressão seletiva da população do presente estudo e; (v) amostras de DAEC Afa/Dr podem representar um importante reservatório de genes de resistência a antimicrobianos, além de diversos fatores de virulência.

Palavras-chaves: 1. *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC). 2. Família de adesinas Afa/Dr. 3. Genes de virulência. 4. Formação de biofilme. 5. Susceptibilidade a antimicrobianos. 6. Sorogrupos.

ABSTRACT

The diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC), a diarrheagenic pathotype of *E. coli*, represent a heterogeneous group without a virulence marker common to all isolates and with a controversial role in childhood diarrhea. The aim of this study was to characterize phenotypic and genotypic samples of DAEC, with or without Afa/Dr adhesins, isolated from children with and without diarrhea. In 70 samples DAEC, PCR was performed to search for genes described in DAEC, EAEC or UPEC, encoding: (i) eight fimbrials and afimbrials (*fimH*, *papC*, *sfa*, *aggA*, *aafA*, *agg3A*, *aida/aah*, *afaC*), (ii) five toxins (*pet*, *astA*, *set1A*, *sat*, *hlyA*), (iii) three iron-chelators (*irp2*, *yucA*, *chuA/shuA*), (iv) invasin (*daad*) and; antigen 43 (*agn43*). Biofilm formation assay was carried out from the bacteria grown in Luria-Bertani broth and inoculated in microtiter plates with DMEM 0.4% glucose. Optical density (OD₄₉₀) was measured after safranin staining. Seroagglutination for 23 O antigens (Probac Brazil) was performed in 50% of DAEC strains. Disk diffusion method was conducted to test the susceptibility to 13 antimicrobial agents. The presence of at least one gene encoding for adhesins, toxins, iron chelators or invasin were found in 58.6%, 51.4%, 80% and 48.6%, respectively, with the genes *fimH*, *irp2*, *agn43*, *yucA*, *chuA/shuA*, present in over 50% of the strains. *afaC*+ gene (PCR+) and/or *afaBC*+ probe (colony hybridization) classified 50% of DAEC as Afa/Dr, being *pet*, *sat*, *irp2*, *yucA*, *chuA/shuA* and *agn43* significant in these strains ($p < 0,05$). Of the 70 DAEC, 44.3% were biofilm former, equally present among Afa/Dr and non Afa/Dr, and no gene has been associated with this phenotype. Serology of 35 strains showed the following serogroups: 1 O29, 2 O125, 2 O127 and 7 O86. All O86 were DAEC Afa/Dr. Higher frequency of antimicrobial resistance were found for ampicillin (55.7%), trimethoprim/sulfamethoxazole (35.7%) and tetracycline (28.6%) and the pattern resistant/intermediate to amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim was significant in Afa/Dr DAEC, as well as the multi-drug resistance ($p < 0.05$). In conclusion, we observed: (i) a high frequency of *fimH* and *pet* and the presence of *agn43*, hitherto not described in DAEC, at similar frequencies to those found in EAEC, UPEC and EAEC/UPEC, respectively; (ii) that the samples Afa/Dr and non Afa/Dr DAEC constituted groups with different genetic profiles to each other; (iii) a few serogroups were found among DAEC; (iv) smaller resistance frequencies when compared with the few descriptions of DAEC, suggesting a lower selective pressure of the population of the present study and; (v) DAEC Afa/Dr strains may represent an important reservoir of antibiotic resistance genes, beyond several virulence factors.

Key-words: 1. Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC). 2. Afa/Dr adhesins family. 3. Virulence genes. 4. Biofilm forming. 5 Antimicrobial susceptibility. 6. Serogroups.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da patogênese dos patótipos de DEC.

Figura 2 – Padrão de aderência difusa (DA) em células HEp-2.

Figura 3 – Organização genética de seis operons da família de adesinas Afa/Dr.

Figura 4 – Patogenicidade de DAEC Afa/Dr.

Figura 5 – Fotografia de gel de agarose com fragmentos de DNA amplificados do gene *daaD* (estabelecido neste estudo) e corado com brometo de etídio.

Figura 6 – Microplaca de ensaio de formação de biofilme mostrando diferentes intensidades de cor entre amostras aplicadas em triplicata.

Figura 7 – Ensaio de hemolisina com amostras DAEC repicadas em *spots*.

Figura 8 - Relação dos resultados entre sonda *afaBC* e PCR *afa/daaD*.

LISTA DE QUADROS E GRÁFICO

QUADROS

Quadro 1 – Relação entre fatores de virulência e patótipos de origem de *E. coli*.

Quadro 2 – Toxinas e proteínas captadoras/receptora de ferro.

Quadro 3 – Programas de amplificação usados nas PCR monoplex com respectivas sequências de iniciadores e fragmentos obtidos.

Quadro 4 – Programas de amplificação usados nas PCR multiplex com respectivas sequências de iniciadores e fragmentos obtidos.

Quadro 5 – Controles positivos utilizados nas PCR.

Quadro 6 - Repertório de genes de virulência nas amostras de DAEC (n=70).

Quadro 7 – Repertório de genes das DAEC Afa/Dr.

Quadro 8 – Repertório de genes das DAEC não Afa/Dr.

GRÁFICO

Gráfico 1 – Resultado do teste de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão do disco para as 70 amostras de DAEC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência dos genes pesquisados nas 70 amostras de DAEC.

Tabela 2 – Amostras positivas para pelo menos um gene de cada grupo de gene, isoladas de crianças com e sem diarreia.

Tabela 3 – Distribuição dos genes em amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr.

Tabela 4 – Número total de genes positivos encontrados por amostra nas DAEC Afa/Dr e DAEC não Afa/Dr.

Tabela 5 – Relação entre a produção de biofilme e a presença de genes associados com aderência bacteriana.

Tabela 6 – Frequência de R/I em amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – *Aggregative adherence* (Aderência agregativa)
- AAFs – *Aggregative adherence fimbriae* (Fímbrias de aderência agregativa)
- CD – *Crohn's disease* (Doença de Crohn)
- CEA – *Carcinoembryonic antigen* (Antígeno carcinoembrionário)
- CEACAM1 – *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule type 1* (Molécula de adesão de tipo 1 relacionada ao antígeno carcinoembrionário)
- CEACAM6 – *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule type 6* (Molécula de adesão de tipo 6 relacionada ao antígeno carcinoembrionário)
- CH – Colite hemorrágica
- CHO – *Chinese hamster ovary* (Células de ovário de hamster chinês)
- CHO-K1 – *Chinese hamster ovary K1* (Células de ovário de hamster chinês K1)
- CRP – *Complement regulatory protein* (Proteína de regulação do complemento)
- DA – *Diffusely adherent* (Aderência difusa)
- DA-EPEC – *Diffusely adherent enteropathogenic Escherichia coli* (*E. coli* enteropatogênica de aderência difusa)
- DAEC – *Diffusely adherent E. coli* (*E. coli* de aderência difusa)
- DAF – *Human Decay-Accelerating Factor*
- DCA – *DAF clustering assay*
- DEC – *E. coli diarrheagenic* (*E. coli* diarreio gênica)
- DMEM – *Dulbecco's modified Eagle medium* (Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco)
- DO – Densidade óptica
- EAEC – *Enteraggregative E. coli* (*E. coli* enteroagregativa)
- EHEC – *Enterohaemorrhagic E. coli* (*E. coli* enteroemorragica)
- EIEC – *Enteroinvasive E. coli* (*E. coli* enteroinvasora)
- EPEC – *Enteropathogenic E. coli* (*E. coli* enteropatogênica)
- aEPEC – *Atypical EPEC* (EPEC atípica)
- tEPEC – *Typical EPEC* (EPEC típica)
- ETEC – *Enterotoxigenic E. coli* (*E. coli* enterotoxigênica)
- ExPEC – *Extraintestinal pathogenic E. coli* (*E. coli* associada a infecção extraintestinal)
- GPA – *Gentamicin protection assay* (Ensaio de proteção com gentamicina)
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- HeLa – Célula de linhagem derivada de carcinoma cervical de Henrietta Lacks

HEp-2 – *Human epithelial cells* (célula de linhagem derivada de carcinoma de laringe humano)

IBD – *Inflammatory bowel disease* (Doença do intestino inflamado)

LB – Luria Bertani

LEE – *Locus of enterocyte effacement* (Locus de achatamento do enterócito)

LT – *Heat-labile toxin* (Enterotoxina termo-lábil)

MHC-I – *Molecules histocompatibility complex 1* (Moléculas do complexo de histocompatibilidade 1)

MNEC – *Meningitis neonatal E. coli* (*E. coli* associada a meningite neonatal)

MSHA – *Mannose-sensitive hemagglutination* (Hemoaglutinação sensível a manose)

MRHA – *Mannose resistant hemagglutination* (Hemoaglutinação resistente a manose)

PAI – *Pathogenicity island* (Ilha de patogenicidade)

PBS – *Phosphate buffer saline* (Tampão salina-fosfato)

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

PMNL – *Polymorphonuclear leucocytes* (Leucócitos polimorfonucleares)

ST – *Heat-stable toxin* (Enterotoxina termo-estável)

STEC – *Shiga toxin producing E. coli* (*E. coli* produtora de Shiga toxina)

TJ - *Tight junction*

TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha* (Fator alfa de necrose tumoral)

TTSS – *Type three secretion system* (Sistema de secreção tipo III)

Stx – *Shiga toxin* (Toxina de Shiga)

TA – Temperatura ambiente

UPEC – *Uropathogenic E. coli* (*E. coli* uropatogênica)

UTI – *Urinary tract infection* (Infecção do trato urinário)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 <i>Escherichia coli</i> E PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS.....	15
2.2 <i>Escherichia coli</i> DE ADERÊNCIA DIFUSA (DAEC)	17
2.2.1 Breve histórico	17
2.2.2 Fatores de Virulência	18
2.2.2.1 <u>Adesinas</u>	18
2.2.2.1.1 <i>Afa/Dr</i>	19
2.2.2.1.2 <i>AIDA-I</i>	20
2.2.2.1.3 <i>Outras adesinas</i>	21
2.2.2.2 <u>Toxinas e proteínas captadoras/receptor de ferro</u>	23
2.2.2.3 <u>Invasão celular</u>	24
2.2.2.4 <u>Formação de biofilme</u>	24
2.2.3 Patogênese	25
2.2.4 Resistência a antimicrobianos	27
2.2.5 Identificação laboratorial	27
2.2.6 Epidemiologia	28
3 OBJETIVO	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 AMOSTRAS.....	31
4.2 TESTES GENOTÍPICOS.....	31
4.2.1 Extração do DNA bacteriano	31
4.2.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	32
4.3 TESTES FENOTÍPICOS.....	35
4.3.1 Formação de biofilme em superfície abiótica	35
4.3.2 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	36
4.3.3 Sorologia	36
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5 RESULTADOS	38
5.1 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....	38

5.1.1	Descrição dos genes pesquisados entre os isolados de DAEC.....	38
5.1.2	Caracterização de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr.....	41
5.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	45
5.2.1	Formação de biofilme em superfície abiótica.....	45
5.2.2	Determinação de sorogrupos.....	46
5.2.3	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos.....	46
6	DISCUSSÃO.....	49
6.1	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....	49
6.1.1	Do total de amostras de DAEC.....	49
6.1.2	Das amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr.....	53
6.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	55
6.2.1	Ensaio de biofilme em superfície abiótica.....	55
6.2.2	Sorologia.....	58
6.2.3	Ensaio de suscetibilidade a antimicrobianos.....	58
7	CONCLUSÃO.....	60

1 INTRODUÇÃO

As doenças diarréicas compreendem uma importante causa de morbidade e mortalidade infantil e representam um problema de saúde pública. Os patótipos diarreiogênicos de *Escherichia coli* (DEC) são uma das principais causas bacterianas de diarreia aguda e persistente em países em desenvolvimento e alguns são reconhecidos como enteropatógenos emergentes em países desenvolvidos (NATARO, KAPER, 1998; GUION et al., 2008).

A *E. coli* de aderência difusa (DAEC), o sexto patótipo descrito de DEC, tem participação ainda incerta na diarreia (FORESTIER et al., 1996; MERAZ et al., 2008). Alguns estudos apontam para a DAEC como causa de diarreia infantil relacionada à idade, e também em imunocomprometidos (ALBERT et al., 1999; OKEKE et al., 2000; SCALETSKY et al., 2002; SPANO et al., 2008; MERAZ et al., 2008; GARCIA et al., 2010; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013). Porém, os mecanismos relacionados com a gênese da diarreia precisam ser elucidados. Sugere-se a existência de um subgrupo patógeno de DAEC, portador de adesinas da família Afa/Dr, potencialmente capaz de causar diarreia (SERVIN, 2005).

A DAEC, caracterizada pelo padrão de aderência difusa em cultura de células HeLa ou HEp-2 e ausência de marcadores moleculares que identificam outros patótipos de DEC, pode carrear genes descritos em outros patótipos de *E. coli*, como aqueles que codificam adesinas e toxinas de *E. coli* uropatogênica (UPEC) e de *E. coli* de aderência agregativa (EAEC).

A complexa interação entre DAEC e as células hospedeiras é pouco elucidada. Embora a formação de biofilme seja bem estabelecida para a EAEC, somente um estudo recente descreve este fenômeno para a DAEC. O potencial de transferência de genes de resistência antimicrobiana juntamente com o fenótipo DA foi previamente descrito (LOPES et al., 2005), porém poucos estudos descrevem o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em DAEC (PEIFFER et al., 2002; GUIGNOT et al., 2009; MARIN-ESTEBAN et al., 2012).

O presente estudo tem a finalidade de caracterizar genotipicamente e fenotipicamente amostras de DAEC isoladas de crianças de comunidades

Quilombolas e da periferia do norte de São Mateus e Conceição da Barra, ES, pela pesquisa de 18 possíveis marcadores de virulência por PCR e da capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica e de susceptibilidade a antimicrobianos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Escherichia coli* E PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS

A *E. coli* é um microorganismo gram negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que coloniza o trato gastrointestinal poucas horas após o nascimento, e constitui o anaeróbio facultativo mais abundante da microbiota intestinal (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). Exceto nos casos em que a barreira gastrointestinal é rompida ou no caso de imunocomprometidos, a *E. coli* se comporta como um comensal que coexiste em harmonia com o hospedeiro humano com benefícios mútuos (NATARO, KAPER, 1998). Contudo, a evolução deste microorganismo permitiu o surgimento de vários clones, altamente adaptados, através da aquisição de atributos específicos de virulência comumente codificados em elementos gênicos móveis, como plasmídios e *transposons*, e esses criaram novas combinações gênicas (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). Os novos atributos de virulência permitiram a adaptação a novos nichos e conferiram a capacidade de causar doenças em hospedeiros que até então viviam em harmonia, dando origem aos patotipos de *E. coli* com potencial de causar infecções extraintestinais (ExPEC) e infecções gastrointestinais (NATARO, KAPER, 1998; KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

E. coli uropatogênica (UPEC) e *E. coli* associada à meningite e sepse (MNEC) são patotipos de ExPEC (NOWICHI *et al*, 1989; JOHNSON, 1991; DAWSON, EMERSON, BURNS, 1999; ANDERSON *et al*, 2003). Os patotipos implicados com infecções gastrointestinais, denominados *E. coli* diarreioagênica (DEC), são classificados com base na patogênese e nos atributos de virulência em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroemorrágica (EHEC) ou produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Figura 1) (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). A presença de determinados sorogrupos (antígeno O) e sorotipos (antígenos O e H) foram implicados com síndromes clínicas específicas, como surtos de diarreia, o que contribuiu com o diagnóstico laboratorial de patotipos de *E. coli*, como para EPEC, EIEC e EHEC (KAPER, NATARO,

MOBLEY, 2004). O diagnóstico dos patótipos de *E. coli* através da sorologia foi substituído pela identificação de fatores de virulência, já que determinados sorotipos passaram a agrupar cepas geneticamente heterogêneas e por não ser conhecida a relação entre a presença dos sorogrupos e genes relacionados com a virulência nos isolados de *E. coli* (NATARO, KAPER, 1998; PEREIRA et al., 2007).

Nos itens seguintes serão abordados temas referentes à DAEC, que é objeto deste estudo.

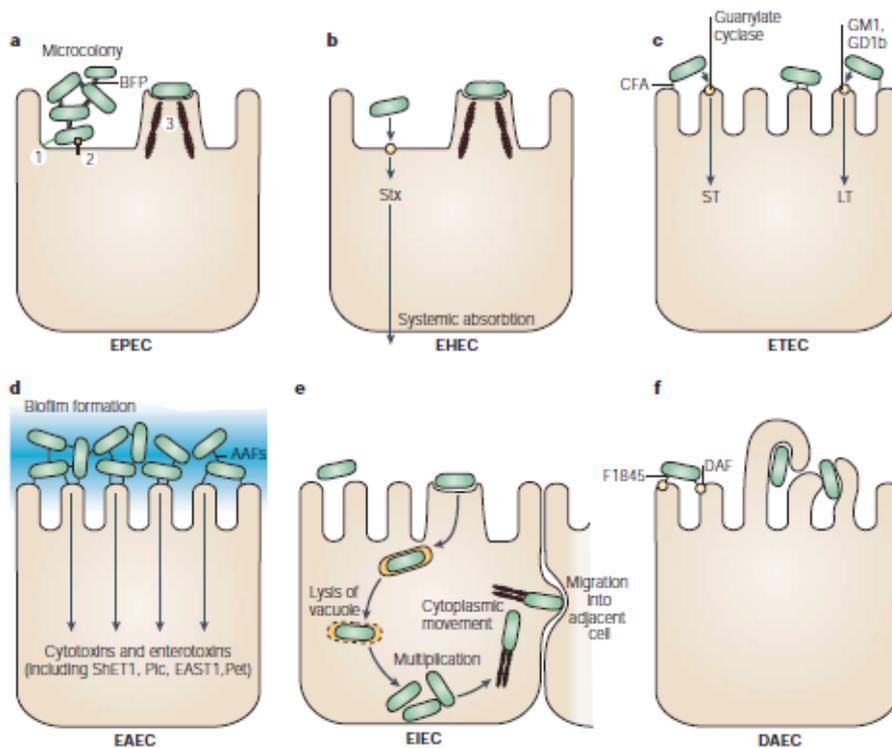


Figura 1 – Esquema da patogênese dos patótipos de DEC. **a.** Aderência de EPEC à borda em escova dos enterócitos, seguida por destruição das microvilosidades, com formação de uma lesão característica denominada *Attaching and Effacing* (Lesão A/E) e formação de pedestais. **b.** EHEC é caracterizada pela elaboração da toxina de Shiga (Stx) e, assim como EPEC, pode produzir Lesão A/E e formação de pedestais nos enterócitos. **c.** A aderência de ETEC é seguida pela secreção das enterotoxinas termo-estável (ST) e/ou termo-lábil (LT), que resultam em diarreia aquosa. **d.** A aderência de EAEC é seguida pela elaboração de enterotoxinas e citotoxinas e pela formação de biofilme. **e.** EIEC é capaz de invadir células M, posteriormente enterócitos baso-lateralmente, e se multiplicar dentro de vesículas, e seguir a invasão de células adjacentes, com forte reação inflamatória. **f.** A ligação de DAEC aos enterócitos é mediada por adesinas características e pode induzir a formação de projeções celulares que envolvem a bactéria (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

2.2 *Escherichia coli* DE ADERÊNCIA DIFUSA (DAEC)

2.2.1 Breve histórico

Na década de 80, alguns estudos descreveram amostras de *E. coli* com padrão de aderência difusa (DA) em cultura de células HeLa e HEP-2 (Figura 2), isoladas de pacientes com diarreia e de indivíduos saudáveis (SCALETSKY, SILVA, TRABULSI, 1984, 1985; NATARO et al., 1985, 1987; ECHEVERRIA et al., 1987; MATHEWSON et al., 1987; LEVINE et al., 1988; BENZ, SCHMIDT, 1989; GOMES, BLAKE, TRABULSI, 1989). A capacidade diarreiogênica de amostras com o padrão DA passou a ser sugerida, principalmente após Bilge et al. (1989) identificarem e descreverem a cepa C1845 (com padrão DA), isolada das fezes de criança com diarreia persistente, de quem nenhum outro patógeno foi identificado. Posteriormente, Giron et al. (1991) identificaram vários enteropatógenos durante um pico de diarreia infantil numa aldeia Maia no México, e apenas isolados de *E. coli* com padrão DA foram estatisticamente associados à diarreia, sendo, pela primeira vez, designados *E. coli* de aderência difusa (DAEC). Outros estudos passaram a identificar amostras de DAEC em fezes, principalmente de crianças, e esse grupo passou a ser considerado o sexto patotipo de DEC descrito (CRAVIOTO et al., 1991; KERNEIS et al., 1991; JALLAT et al., 1993; SERVIN, 2005; LE BOUGUENEC, SERVIN, 2006).

A DAEC tem sido isolada de crianças com e sem diarreia, e sua real importância na diarreia infantil ainda necessita ser elucidada (SERVIN, 2005; LE BOUGUENEC, SERVIN, 2006). Esse patotipo é considerado um grupo heterogêneo, sendo o padrão DA o único fenótipo comum a todos os isolados (Figura 2) (GIRON et al., 1991; BAQUI et al., 1992; JALLAT et al., 1993; LEVINE et al., 1993; KYAW et al., 2002; SCALETSKY et al., 2002b; TADDEI et al., 2003; LE BOUGUENEC, SERVIN, 2006; MERAZ et al., 2007; GUIGNOT et al., 2007).

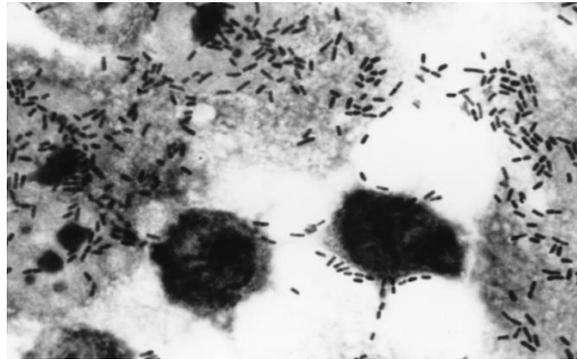


Figura 2 – Padrão de aderência difusa (DA) de *E. coli* em células HEp-2 (NATARO, KAPER, 1998).

2.2.2 Fatores de Virulência

Pouco se conhece sobre os fatores que poderiam estar associados à virulência em DAEC, e dentre estes se tem adesinas, toxinas, proteínas captadoras de ferro e capacidade de invasão celular (TADDEI et al., 2003; LOPES et al., 2005; SOBIESZCZANSKA et al., 2006; GUIGNOT et al., 2007), que serão abordados nos itens a seguir. No quadro 1 podem ser observados possíveis fatores de virulência descritos em amostras de DAEC, EAEC e/ou de UPEC.

2.2.2.1 Adesinas

As adesinas bacterianas são responsáveis pela aderência ao epitélio intestinal, e podem aparecer como estruturas longas, conhecidas como *hair-like*, denominadas Pili ou Fímbria, ou ainda como uma estrutura amorfa ligada à membrana, denominada Bainha Afimbrial (SOTO, HULTGREN, 1999).

As adesinas características de DAEC, pertencentes à família Afa/Dr e à AIDA-I, são responsáveis pelo padrão DA em cultura de células e também contribuem com a subdivisão de DAEC em duas classes: DAEC típica ou DAEC Afa/Dr, e DAEC atípica, ambas podendo ainda ser subdividas em duas subclasses (WACHTER et al., 1999; NOWICKI, SELVARANGAN, NOWICKI 2001; SERVIN, 2005; GUIGNOT et al., 2007). A expressão de outras adesinas também são descritas em DAEC (MARQUES et al., 1995; MARTINEZ et al., 2000; LOPES et al., 2005; GUIGNOT et al., 2007). Estas adesinas serão descritas a seguir.

Quadro 1 – Relação entre fatores de virulência e patotipos de origem de *E. coli*

Genes	Localização	Descrição	Patotipo	Atividade
<i>fimH</i>	Cromossomo	Proteína FimH (fímbria tipo 1)	Todos	Adesinas
<i>papC</i>	Cromossomo	Fímbria P	UPEC	
<i>sfa</i>	Cromossomo	Fímbria S	UPEC, MNEC	
<i>aggA;aafA;agg3A</i>	Plasmídio	Fímbrias de aderência agregativa	EAEC	
<i>afaC</i>	Cromossomo ou Plasmídio	Família adesinas Afa/Dr	DAEC, UPEC	
<i>aida/aah</i>	Plasmídio	AIDA-I/AAH	DAEC	
<i>hlyA</i>	PAI*	α -Hemolisina	UPEC	Toxinas
<i>pet</i>	Plasmídio	Serina protease PET	EAEC	
<i>astA</i>	Plasmídio	Toxina termoestável EAST1	EAEC	
<i>set1A</i>	Cromossomo	Enterotoxina de <i>S. flexneri</i> - SheT1	EAEC	
<i>sat</i>	PAI*	Toxina autotransportadora	UPEC	
<i>irp2</i>	Cromossomo	Yersiniabactina	Vários	Proteínas captadoras/receptora de ferro
<i>iucA</i>	Cromossomo ou Plasmídio	Sintetase de aerobactina	EIEC	
<i>chuA/shuA</i>	Cromossomo	Receptor heme	UPEC, EIEC, MNEC	
<i>daaD</i>	Cromossomo ou Plasmídio	Invasina C1845	DAEC	Invasina
<i>agn43</i>	Cromossomo	Antígeno 43	EAEC, UPEC	Antígeno 43

* PAI – Ilha de patogenicidade

2.2.2.1.1 *Afa/Dr*

A *Afa/Dr* constitui uma família de 13 adesinas com estruturas fimbriais e afimbriais, sendo elas: *AfaE-I*, *AfaE-II*, *AfaE-III*, *AfaE-V*, *Afa-VII*, *Afa-VIII*, *Dr*, *Dr-II*, *F1845*, *Nfa-I*, *AAF-I*, *AAF-II* e *AAF-III* (GARCIA, LABIGNE, LE BOUGUENEC, 1994; NOWICKI, SELVARANGAN, NOWICKI, 2001; LE BOUGUENEC et al., 2001; SERVIN, 2005; ALTROFF et al., 2006). Conforme Servin (2005), todas estas adesinas atuam como fatores de virulência em DAEC.

As adesinas com estruturas afimbriais foram inicialmente classificadas como pertencentes à família *Afa* (LABIGNE-ROUSSEL et al., 1984 e 1988), enquanto que aquelas que reconheciam o antígeno de grupo sanguíneo *Dr*, presente na molécula *Human Decay-Accelerating Factor* (DAF ou CD55), foram classificadas como pertencentes à família *Dr* (BILGE et al., 1984; NOWICKI et al., 1987). Conforme capacidade das adesinas *Afa/Dr* de reconhecerem ou não (*Afa-VII*, *Afa-VIII*, *AAF-I*, *AAF-II* e *AAF-III*) DAF como receptor, elas são nomeadas como *Afa/Dr⁺* e *Afa/Dr⁻*, respectivamente (NOWICKI et al., 1990; LE BOUGUENEC et al., 2001; SERVIN, 2005; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013). As que se ligam à DAF são também reconhecidas como DAEC_{DAF} (SERVIN, 2005; GUIGNOT et al., 2007). Determinadas adesinas *Afa/Dr* podem ainda reconhecer membros da família CEAECAM e/ou colágeno tipo IV como receptores em células hospedeiras (BERGER et al., 2004; GUIGNOT et al., 2000; SELVARANGAN et al., 2004).

Cada adesina *Afa/Dr* é codificada por um operon composto de pelo menos cinco genes (*A* a *E*) (Figura 3). Os operons que codificam as adesinas *Afa/Dr* apresentam similaridade em sua organização, e são altamente conservados entre os genes *A* e *D*, sendo o gene *E* o mais divergente entre os membros da família (GARCIA, LABIGNE, LE BOUGUENEC, 1994). Os produtos dos genes *A*, *B*, *C*, *D* e *E* são identificados como um regulador transcriptional, uma chaperona periplasmática, uma proteína de ancoragem de membrana externa, uma invasina e o produto estrutural da adesina, respectivamente (SERVIN, 2005). O produto final de cada adesina *Afa/Dr* é composto pela invasina e pelo produto estrutural da adesina (GARCIA et al., 1996).

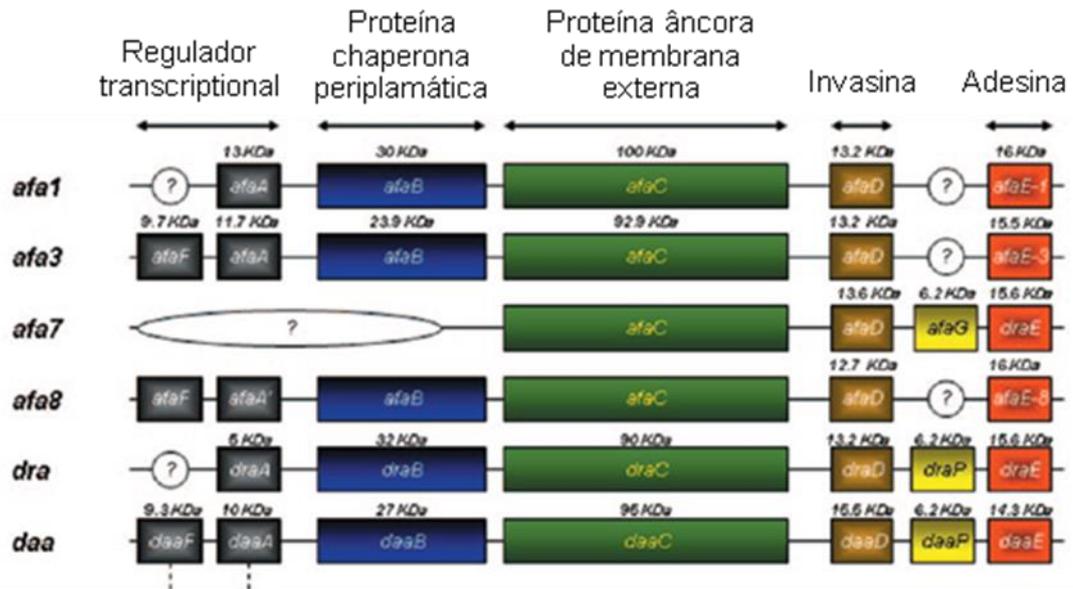


Figura 3 – Organização genética de seis operons da família de adesinas Afa/Dr. Os operons *afa1*, *afa3*, *afa7*, *afa8*, *dra* e *daa* codificam as adesinas AfaE-I, AfaE-III, AfaE-VII, AfaE-VIII, DraE e F1845, respectivamente (SERVIN, 2005).

2.2.2.1.2 AIDA-I

A adesina AIDA-I foi identificada e caracterizada a partir da cepa 2787, sorotipo O126:H27, isolada de fezes de criança com diarreia (BENZ, SCHMIDT, 1989). Sua presença é limitada a um pequeno número de amostras de DAEC e sua expressão representa uma potencial causa de diarreia infantil (BENZ, SCHMIDT, 1989, 1992, 1992b, 2001; JALLAT et al., 1993, 1994; GERMANI et al., 1996; WACHTER et al., 1999; SCALETSKY et al., 2002; SHERLOCK et al., 2004; SERVIN, 2005).

A expressão de AIDA-I ocorre através da produção de uma proteína precursora, mediado pelo gene plasmidial *aidA*, glicosilada por uma heptiltransferase (AAH), codificada pelo gene *aah*, que resulta na adesina AIDA-I madura (SUHR, BENZ, SCHMIDT, 1996; BENZ, SCHMIDT, 2001; LAARMANN, SCHMIDT, 2003; CHARBONNEAU, MOUREZ, 2008). A ausência da glicosilação de AIDA-I por AAH impede a ligação da adesina às células hospedeiras, sendo necessário ambos os genes, *aida* e *aah*, para a função da adesina (BENZ, SCHMIDT, 1992, 2001; LAARMANN, SCHMIDT, 2003).

A AIDA-I, juntamente com o antígeno 43, pertence ao grupo de proteínas denominado *self-associating autotransporters* (SAAT) (CHARBONNEAU,

BERTHIAUME, MOUREZ, 2006), pois compartilham propriedades como: (i) auto-associação, que possibilita a formação de agregados bacterianos; (ii) associação entre elas (AIDA-I e Agn43), com formação de agregados bacterianos mistos e; (iii) capacidade de formação de biofilme (KLEMM, VEJBORG, SHERLOCK, 2006; GIRARD et al., 2010).

2.2.2.1.3 Outras adesinas

As adesinas fimbriais como a fímbria tipo 1, P e S, consideradas fatores de virulência em isolados responsáveis por infecções do trato urinário (Quadro 1), foram também descritas em DAEC (LE BOUGUENEC, ARCHAMBAUD, LABIGNE, 1992; MARQUES et al., 1995; MULVEY et al., 1998; LOPES et al., 2005; GUIGNOT et al., 2007).

As fímbrias tipo 1 são expressas por uma ampla variedade de *E. coli*, patogênica e não patogênica, e até o momento são implicadas somente com a patogenicidade de UPEC (JONES et al., 1995; CONNELL et al., 1996; SOKURENKO et al., 1998; HASMAN, CHAKRABORTY, KLEMM, 1999; JOHNSON, STELL, 2000; SCHEMBRI, CHRISTIANSEAN, KLEMM, 2001; TARTOF et al., 2007; KARAN et al., 2012). A proteína FimH é codificada pelo operon *fim*, de localização cromossômica, e expressa na ponta do eixo fimbriar da fímbria tipo 1. A FimH interage com receptores contendo moléculas de manose em células hospedeiras, com superfícies abióticas e ainda pode capacitar a formação de biofilme (KLEMM et al., 1985; KROGFELT, BERGMANS, KLEMM, 1990; JONES et al., 1995; SCHEMBRI, CHRISTIANSEAN, KLEMM, 2001; TARTOF et al., 2007; KISIELA et al., 2013).

As fímbrias P e S são codificadas pelos genes *pap* e *sfa*, respectivamente, ambos de localização cromossômica (LUND et al., 1988; HACKER et al., 1993). Essas fímbrias são relacionadas com a colonização de UPEC em superfícies hospedeiras e também podem estar envolvidas com a formação de biofilme (LE BOUGUENEC, ARCHAMBAUD, LABGNE, 1992; ONG et al., 2008).

2.2.2.2 Toxinas e proteínas captadoras/receptor de ferro

Genes que codificam toxinas e proteínas captadoras e receptoras de ferro, encontrados em outros patótipos de *E. coli* (Quadro 2), foram descritos também em DAEC e dentre estes estão as toxinas Pet, EAST1 e ShET1, e as proteínas captadoras de ferro lucA e Irp2, característicos de EAEC, e as toxinas Sat e α -hemolisina, características de UPEC (Quadros 1 e 2) (ESLAVA et al., 1998; CZECZULIN et al., 1999; GUYER et al., 2000; TADDEI et al., 2003; LOPES et al., 2005; HUANG et al., 2006, 2007).

Quadro 2 – Toxinas e proteínas captadoras/receptora de ferro

Grupo	Gene	Proteína	Função	Referência
Toxinas	<i>pet</i>	PET	Proteína autotransportadora, proteolítica, que possivelmente degrada espectrina em células intestinais e eritrócitos, e pode estar envolvida com a descamação de células epiteliais. Pertence à família SPATE (<i>Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriace</i>).	Eslava et al., 1998; Henderson, Nataro, 2001; Taddei et al., 2003; Guignot et al., 2007
	<i>sat</i>	SAT	Atividade citopática e proteolítica e pode induzir lesões nas <i>tight junctions</i> através da atuação conjunta com Pet. Pertence à família SPATE.	Guyer et al., 2000; Guignot et al., 2007
	<i>astA</i>	EAST1	Induz alterações no transporte de íons, com aumento na resposta secretória pelas células hospedeiras.	Savarino et al., 1991
	<i>set1A</i>	ShET1	Descrita inicialmente em <i>Shigella flexneri</i> , possui capacidade de induzir o acúmulo de líquidos.	Fasano et al., 1995
	<i>hlyA</i>	α -Hemolisina	Leva a formação de poros aquosos na célula-alvo, com perda dos conteúdos intracelulares.	Elliot et al., 1998; Guinot et al., 2000
Proteínas captadoras/receptora de ferro	<i>irp2</i>	Irp2	Biossíntese da Yersiniabactina. Quelante de ferro.	Czczulin et al., 1999
	<i>iucA</i>	IucA	Sintetase envolvido na síntese da aerobactina. Quelante de ferro.	De Lorenzo, Neilands, 1986; Lopes et al., 2005
	<i>chuA/shuA</i>	Chu	Receptor heme que atua para obtenção de ferro	Torres, Payne, 1997

2.2.2.3 Invasão celular

Invasão celular foi descrita para alguns isolados de DAEC Afa/Dr, por mecanismos não totalmente esclarecidos (JOUVE et al., 1997; PLANÇON et al., 2003; GUIGNOT et al., 2009). A invasão parece ocorrer em duas etapas, a primeira, envolvendo a ligação bacteriana às células hospedeiras, mediada por AfaE, e a segunda, a internalização, mediada por AfaD, principalmente na presença dos receptores da família Afa/Dr (JOUVE et al., 1997; GARCIA et al., 1996, 2000; GOUNON, JOUVE, LE BOUGUENEC, 2000; GUIGNOT et al. 2009).

2.2.2.4 Formação de biofilme

A formação de biofilme, comunidade bacteriana embebida em uma matriz polimérica, é um importante aspecto da capacidade patogênica bacteriana, tanto quando formado em superfícies bióticas, como no intestino e na bexiga, quanto em superfícies abióticas, como cateteres e próteses (COSTERTON, STEWART, GREENBERG, 1995; SOTO et al., 2007). Em sua formação, adesinas podem ser responsáveis pela aderência bacteriana a superfícies, seguido do desenvolvimento da arquitetura do biofilme e diferenciação de microcolônias dentro da matriz polissacarídica, que resulta no biofilme maduro (COSTERTON, STEWART, GREENBERG, 1999). O biofilme maduro pode liberar bactérias planctônicas, e essas podem rapidamente se multiplicar e se dispersar (COSTERTON, STEWART, GREENBERG, 1999)

Bactérias capazes de formar biofilme normalmente são relacionadas com infecções persistentes, pois criam uma barreira contra a resposta do hospedeiro e contra a ação de antimicrobianos (SHEIKH et al., 2001). A formação de biofilme por DAEC foi descrita só recentemente e seu mecanismo ainda precisa ser elucidado (MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013). Genes de virulência que participam da formação de biofilme tem sido descritos para os patótipos EAEC e UPEC como os genes *agn43* e *fimH* (JALLAT et al., 1995; PRATT, KOLTER, 1998; LOPES et al., 2005; SERVIN et al., 2005; GIRARD et al., 2010). O antígeno 43, codificado pelo gene *agn43*, ainda não descrito em isolados de DAEC, foi associado com a formação de agregados bacterianos através da sua associação com AIDA-I; assim

como, AIDA-I expressas por *E. coli* K12 levam à autoagregação bacteriana (ENDERSON, NATARO, 2001; SCHEMBRI et al., 2003; SHERLOCK et al., 2004, 2006; ULETT et al., 2007; MENDEZ-ARANCIBIA et al., 2008; ROWE, WITHERS, SWIFT, 2010).

2.2.3 Patogênese

O mecanismo através do qual se desenvolve a patogênese de DAEC e, principalmente, os fatores de virulência que podem caracterizar um isolado como patogênico ou não, ainda não está elucidado. Sabe-se que após alcançar o trato gastrointestinal, as bactérias aderem a moléculas receptoras no domínio apical da borda em escova no intestino delgado seguido por íntima adesão (KERNEIS et al., 1991; GOLUSZKO et al., 1999; GUIGNOT et al., 2000; BERGER et al., 2004; SERVIN, 2005; CROXEN, FINLAY, 2010). Esta ligação pode promover rearranjo de F-actina, com alongamento e perda das microvilosidades e rompimento das *tight junctions* com consequente aumento de permeabilidade celular (Figura 4) (BERNET-CAMARD et al., 1996; COOKSON, NATARO, 1996; PEIFFER, SERVIN, BERNET-CAMARD, 1996, 1998; PEIFFER et al., 2000). A estrutura alongada da microvilosidade, único à DAEC, confere um aspecto de “bactéria embebida”, que a protege da resposta do hospedeiro e confere resistência à ação de antimicrobianos (YAMAMOTO et al., 1992, 1996; COOKSON, NATARO, 1996; JOUVE et al., 1997).

A DAEC também pode desencadear respostas inflamatórias em células intestinais, que envolvem a liberação da citocina pró-inflamatória IL-8, seguida de migração transepitelial de leucócitos polimorfonucleares (PMNL) (Figura 4) (BETIS et al., 2003; SERVIN, 2005; ARIKAWA et al., 2005; MERAZ et al., 2007; SEMIRAMOTH et al., 2010; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013). A migração de PMNL induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), que levam o aumento na expressão de DAF e MICA (homólogo distante das moléculas do complexo de histocompatibilidade 1 – MHC-I), além de expressão anormal de DAF em domínio basolateral (TIENG et al., 2002; BETIS et al., 2004; MARIN-ESTEBAN et al., 2012). Após interação com DAEC, os PMNL que sofreram transmigração são

induzidos à apoptose, o que prolonga a persistência bacteriana no intestino (BREST et al., 2004).

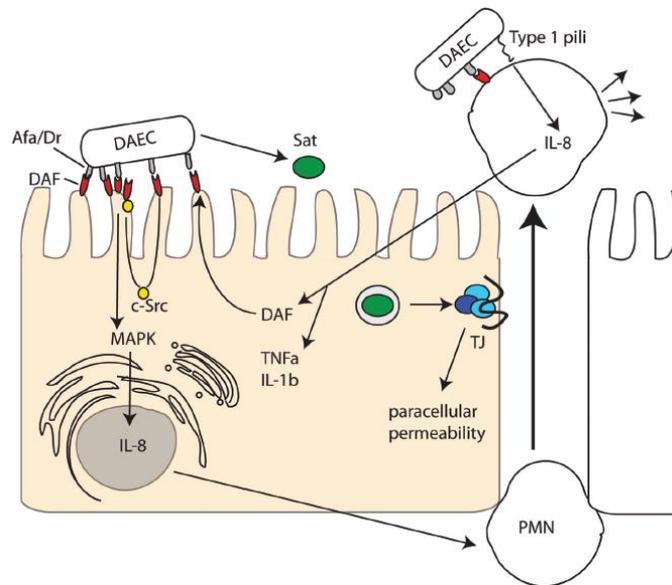


Figura 4 – Patogenicidade de DAEC Afa/Dr. Adesinas Afa/Dr interagem com DAF em células hospedeiras. Ocorre mobilização ativa de DAF ao redor da ligação bacteriana mediando forte ligação e mobilização de IL-8, que induz transmigração de PMNL. A transmigração de PMNL estimula a superexpressão de DAF e síntese de TNF α e IL-1 β . Pili tipo 1 induz liberação de IL-8 de PMNL e apoptose. Sat induz rearranjo das TJ e aumento da permeabilidade paracelular (CLEMMENTS, et al., 2012).

Pesquisas recentes tem apontado uma possível relação entre DAEC Afa/Dr e doenças inflamatórias crônicas do intestino (CANE et al., 2007, 2010; SEMIRAMOTH et al., 2010; MARIN-ESTEBAN et al., 2012). Cane et al. (2010) descreveram que, além da indução de citocinas pró-inflamatórias, DAEC Afa/Dr pode induzir a expressão de genes pró-inflamatórios e pró-angiogênicos em células hospedeiras, e assim contribuir com a gênese de processos inflamatórios e cancerosos do intestino. Em processos inflamatórios do intestino, como nas colites ulcerativas e doenças autoimunes, moléculas DAF são expressas de maneira exacerbadas e podem resultar em alterações na atividade do complemento nos enterócitos (UESU et al., 1995; INABA et al., 1998; BERSTAD, BRANDTZAEG, 1998). Grimm et al. (1996) relatam que esse fenômeno é um mecanismo da doença do intestino inflamado (IBD) e, nesse contexto, isolados DAEC Afa/Dr podem ter alguma importância no desenvolvimento da doença. Outros receptores para

adesinas Afa/Dr, como CEA e CEACAM6, também são encontrados superexpressados em situações de inflamação, como no caso de doenças inflamatórias do cólon e em estágios precoces de câncer de cólon (GRUNERT et al., 1995). Moléculas MICA, expressas no epitélio intestinal normal, aparecem exacerbadas em casos de infecção por DAEC Afa/Dr e em pacientes com Doença de Crohn (GLAS et al., 2001; TIENG et al., 2002).

2.2.4 Resistência a antimicrobianos

A ampla disseminação de resistência bacteriana a antimicrobianos entre as enterobactérias requer o conhecimento do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos tanto de isolados que causam doenças gastrointestinais, que podem demandar tratamento específico, quanto para isolados comensais, pois podem representar um importante reservatório para genes de resistência (BAILEY et al., 2010). Apesar de ser conhecido o potencial de transferência de genes de resistência antimicrobiana juntamente com o fenótipo DA, poucos estudos descrevem o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em DAEC (LOPES et al., 2005; OCHOA et al., 2009).

2.2.5 Identificação laboratorial

A identificação de DAEC se dá através da ausência de marcadores típicos de outros patótipos de *E. coli* e do padrão DA em cultura de células (Figura 2) (SCALETSKY et al., 2002b; KYAW et al., 2003; MERAZ et al., 2007). O padrão DA em cultura de células HeLa ou HEp-2 é considerado o teste padrão-ouro de identificação, contudo trata-se de um método laborioso, realizado somente em laboratórios de pesquisa (SCALETSKY, SILVA, TRABULSI, 1984; NATARO et al., 1985). Como alguns isolados podem apresentar o padrão DA e marcadores característicos de outros patótipos, o ensaio em cultura de células não pode ser considerado sozinho para identificação da DAEC (JALLAT et al., 1993; KYAW et al., 2003; MERAZ et al., 2007).

Ensaio de hibridização, PCR e PCR em tempo real foram desenvolvidos baseados na detecção de sequências conservadas entre os operons que codificam as adesinas Afa/Dr (GUION et al., 2008; GOMEZ-DUARTE et al., 2010; SOUZA 2013). São amplamente utilizados em estudos epidemiológicos para identificação de DAEC, apesar de identificarem somente amostras que portam tal família de adesinas (JALLAT et al., 1994; OKEKE et al., 2000; LE BOUGUENEC et al., 2001; SCALETISKY et al., 2002b; KAPER et al., 2004; SPANO et al., 2008).

Ensaio fenotípico, como o *DAF clustering assay* (DCA), foi desenvolvido para identificar amostras positivas para adesinas Afa/Dr, contudo, assim como os testes de biologia molecular, é limitado para detecção de DAEC visto não ser um marcador comum para todos os isolados de DAEC (GOLUSZKO et al., 2001; KYAW et al., 2002; SERVIN, 2005).

2.2.6 Epidemiologia

A relação da DAEC com a diarreia infantil ainda não está claramente estabelecida, visto que os estudos apresentam resultados discordantes (GIRON et al., 1991; OKEKE et al., 2000; SCALETISKY et al., 2002; SPANO et al., 2008; OCHOA et al., 2009; OPINTAN et al., 2010; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013). Assim como a EAEC, a DAEC, frequentemente isolada de crianças, também foi descrita relacionada com diarreia em adultos (JALLAT et al., 1993; OPINTAN et al., 2010; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013). De igual importância são os estudos casos-controles que não relacionam DAEC com a diarreia infantil (CRAVIOTO et al., 1991; ECHEVERIA et al., 1992; LEVINE et al., 1993; ALBERT et al., 1995; KANG, MATHAN, MATHAN, 1995; POITRINEAU et al., 1995; FORESTIER et al., 1996; FORESTIER et al., 1996; ROSA et al., 1998; GOMES et al., 1998; ALBERT et al., 1999; OKEKE et al., 2000; SCALETISKY et al., 2002c; MERAZ et al., 2008; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013).

Esses resultados divergentes podem ser devido à heterogeneidade entre os isolados, ao método de diagnóstico e ao fato da associação da DAEC com diarreia ser dependente da idade (GIRON et al., 1991; ECHEVERRIA et al., 1992; LEVINE et

al., 1993; JALLAT et al., 1993; GUNZBURG et al., 1993; POITRINEAU et al., 1995; SCALETSKY et al., 2002; SPANO et al., 2008).

Considerando a heterogeneidade inerente ao patótipo, a pesquisa por marcadores de virulência poderia evidenciar cepas com características patogênicas diferentes, que levariam a diversas consequências no hospedeiro, como evidenciado para as adesinas Afa/Dr, relacionadas em alguns estudos com isolados de diarreia infantil (LEVINE et al., 1993; GERMANI et al., 1996; OCHOA et al., 2009).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar genotípica e fenotipicamente e determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* de aderência difusa, portadoras e não portadoras de adesinas Afa/Dr, isoladas de crianças com e sem diarreia, residentes em comunidades Quilombolas e da periferia urbana do norte do Espírito Santo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evidenciar genes que codificam adesinas, toxinas, proteínas captadoras de ferro, invasina e de agregação bacteriana por PCR;
- Analisar repertório de genes encontrados entre os isolados de DAEC de crianças com e sem diarreia;
- Relacionar os genes encontrados nas DAEC com os característicos de EAEC e UPEC;
- Classificar as amostras de DAEC como Afa/Dr e não Afa/Dr através de PCR e hibridização de colônias;
- Analisar a capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica;
- Relacionar formação de biofilme com repertório de genes;
- Descrever o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos;
- Determinar sorogrupos;
- Analisar todos os aspectos fenotípicos e genotípicos entre as amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS

Foram analisadas 70 amostras de DAEC, isoladas de 70 crianças com até 11 anos de idade, sendo 23 destas com e 47 sem diarreia (LOZER et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Destas crianças, 48 residem em comunidades Quilombolas do norte do Espírito Santo, e 22 na periferia urbana dos municípios de São Mateus e Conceição da Barra. As comunidades quilombolas são semi-isoladas e caracterizadas por baixo índice de saneamento básico e acesso restrito ao sistema de saúde.

As amostras de DAEC foram identificadas previamente por ensaio de aderência em cultura de células HEp-2 através da observação do padrão DA, de hibridização de colônias com sonda radioativa ^{32}P para região *afaBC* e pela ausência de marcadores de outros patótipos (LOZER et al., 2013; SOUZA et al., 2013), e estocadas em ágar nutriente inclinado a 8°C e em suspensão de sacarose 24% a -20°C. A recuperação dos estoques se deu através de repique em ágar MacConckey, para análise da pureza do isolado, e em ágar nutriente ou em caldo BHI, para serem submetidas a testes genotípicos (pesquisa de genes de virulência por PCR) e fenotípicos (produção de biofilme e susceptibilidade a antimicrobianos).

4.2 TESTES GENOTÍPICOS

PCR foi realizada para a pesquisa de genes de virulência nas amostras de DAEC, conforme descrito a seguir.

4.2.1 Extração do DNA bacteriano

DNA bacteriano foi extraído por lise térmica, conforme descrito por Aranda et al. (2004). Suspensão de duas colônias bacterianas em 100 µL de água Mili-Q® foi aquecida a 100°C por cinco minutos e centrifugada a 10.000 X g por um minuto. O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi alíquotado e armazenado à -20°C para

posterior ensaio de PCR. Cada microtubo, contendo a suspensão de DNA, foi descongelado no máximo por quatro vezes.

4.2.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Foram pesquisados 18 genes característicos de amostras de DAEC, EAEC ou UPEC (Quadro 1) por PCR multiplex e monoplex, que codificam para oito adesinas, cinco toxinas, três proteínas captadoras/receptora de ferro, invasina e ang43 (Quadros 3 e 4). As cepas utilizadas como controle positivo (CP) estão listadas no Quadro 5.

Para a reação, um volume de 2 µL do DNA extraído foi adicionado a misturas de reações contendo em 25 µL de volume final: 1,5 mM de MgCl₂; tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 µM de cada *primer*; 0,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen® -Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Somente o *primer* para *astA* foi utilizado em concentração de 0,16 µM. Para pesquisa de *aida/ahh*, *aggA*, *aafA*, *agg3A* e de *hlyA* foi utilizado *pool* de DNA de cinco amostras na PCR. Para pesquisa do gene *daaD*, foi desenhado um par de *primer* (Quadro 3), com auxílio do programa *Oligo Analyser Clustal*, a partir da sequência do gene *daaD*, presente no operon *daa* da cepa C1845. A sequência *forward* e *reverse* do *primer* hibridiza na posição 5-26 nt e 228-249 nt do gene *daaD*, respectivamente, e gera um fragmento de 245 pb. A temperatura de hibridização foi calculada em termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems). Em todas as reações foram utilizadas controles positivos (Quadro 5) e controles negativos constituídos por mix adicionado de água. Todas as PCR foram realizadas em termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems), seguindo programas descritos nos Quadros 3 (PCR monoplex) e 4 (PCR multiplex). Os fragmentos obtidos foram observados em sistema de visualização e processamento de imagens MiniBispPro™ (Bio América Inc.) após eletroforese em gel de agarose (Pronadisa) 1,5% corado com brometo de etídio 0,5 mg/mL (Amresco).

Quadro 3 – Programas de amplificação usados nas PCR monoplex com respectivas sequências de iniciadores e fragmentos obtidos

Primer	Sequencia (5'→3')	Tamanho	Condições Amplificação	Referência
<i>hlyA</i>	CTC ATT GGC CTC ACC GAA CGG GCT GGC AGC TGT GTC CAC GAG	299 pb	1x (95°C/5min); 35x (94°C/30seg, 57°C/30seg, 72°C/1min); 1x (72°C/7min)	Guignot et al, 2000
<i>sat</i>	ACT GGC GGA CTC ATG CTG T AAC CCT GTA AGA AGA CTG AGC	387 pb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/25seg, 64°C/1min, 72°C/2,5min); 1x (72°C/7min)	Ruiz et al, 2002
<i>fimH</i>	TCGAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	506 pb	1x (95°C/5min); 33x (94°C/30seg, 58°C/30seg, 72°C/1min); 1x (72°C/7min)	Johnson, Stell, 2000
<i>aggA</i>	TTA GTC TTC TAT CTA GGG AAA TTA ATT CCG GCA TGG	450 pb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/1min, 46°C/1min, 72°C/1min); 1x (72°C/7min)	Czczulin et al, 1999
<i>aafA</i>	ATG TAT TTT TAG AGG TTG AC TAT TAT ATT GTC ACA AGC TC	518 pb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/1min, 50°C/1min, 72°C/1min); 1x (72°C/7min)	Czczulin et al, 1999
<i>agg3A</i>	GTA TCA TTG CGA GTC TGG TAT TCA G GGG CTG TTA TAG AGT AAC TTC CAG	462 pb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/1min, 65°C/1min, 72°C/1min); 1x (72°C/7min)	Bernier et al, 2002
<i>afaC</i>	CGGCTTTTCTGCTGAACTGGCAGGC CCGTCAGCCCCACGGCAGACC	672 pb	1x (95°C/5min); 25x (94°C/1min, 70°C/1min, 72°C/2min); 1x (72°C/7min)	Le Bouguéne c et al, 2001
<i>daaD</i>	ACGGGAGTATAAGGAAGATGAT ATCCTTACTCTGCACCACATAG	245 pb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/1min, 56°C/1min, 72°C/1min); 1x (72°C/7min)	Este estudo
<i>aida/aah</i>	CTCTGGTGCCCTGTACACAAAGGTAC GTCCTCTGGCTAACTCTGAGGCCA	204 pb	1x (95°C/5min); 40x (94°C/15seg, 55°C/20seg, 72°C/30seg); 1x (72°C/7min)	Berthiaume et al, 2010
<i>irp2</i>	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC TCG TCG GGC AGC GTT TCT TCT	264 pb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min); 1x (72°C/7min)	Czczulin et al, 1999
<i>agn43</i>	ACG CAC AAC CAT CAA TAA AA CCG CCT CCG ATA CTG AAT GC	600 pb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min); 1x (72°C/7min)	Mendez-Arancibia et al, 2008

Quadro 4 – Programas de amplificação usados nas PCR multiplex com respectivas sequências de iniciadores e fragmentos obtidos

Primer	Sequencia (5'→3')	Tamanho	Condições Amplificação	Referência
<i>pet</i>	GAC CAT GAC CTA TAC CGA CAG C CCG ATT TCT CAA ACT CAA GAC C	600 pb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min); 1x (72°C/7min)	Huang et al., 2007; Mariane V. Monfardine, 2012
<i>astA</i>	CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT	111 pb		
<i>set1A</i>	TCA CGC TAC CAT CAA AGA TAT CCC CCT TTG GTG GTA	309 pb		
<i>papC</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC C ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	328 pb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/2min, 65°C/1min, 72°C/2min); 1x (72°C/7min)	Le Bouguenec et al, 1992
<i>Sfa</i>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	410 pb		
<i>iucA</i>	ATG CTG CAT CTT AAC CTT CA CTC GTT ATG ATC GTT CAG AT	1.1 kb	1x (95°C/5min); 30x (94°C/30seg, 52°C/30seg, 72°C/1,5min); 1x (72°C/7min)	Okeke et al, 2004
<i>chuA/shuA</i>	ATC TGC TGC GTC ATG TTC CT GTA GTG GTC ATA CCT TTG AGC	1.7 kb		

Quadro 5 – Controles positivos utilizados nas PCR

CP	Genes
EAEC042	<i>pet; astA; set1A; agn43; aafA</i>
C1845	<i>afaC; daaD</i>
<i>E. coli</i> J96	<i>papC; sfa</i>
RN785-1	<i>agg3A; irp2</i>
Cepa LabGln	<i>fimH; hlyA</i>
MA245-5	<i>sat; iucA</i>
EAEC 17-2	<i>aggA</i>
<i>E. coli</i> 2787	<i>aida/aah</i>
EDL933	<i>chuA/shuA</i>

4.3 TESTES FENOTÍPICOS

4.3.1 Formação de biofilme em superfície abiótica

O ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica foi realizado nas amostras de DAEC conforme descrito previamente por Sheikh et al. (2001) para amostras de EAEC e descrito a seguir. Amostras crescidas em ágar MacConkey foram semeadas em 2 mL de caldo Luria Bertani (LB) e incubadas à 37°C por 16 a 18 horas sem agitação. A suspensão bacteriana foi ajustada à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL com auxílio de escala 0,5 de McFarland e 2 μ L foram adicionados em poços de placas de poliestireno de fundo chato (96 poços), seguido pela adição de 200 μ L de Meio Mínimo Essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 0,4% de glicose. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e os poços então lavados por quatro vezes com 200 μ L de PBS (*phosphate buffer saline*) 0,2 M pH 7,2, para remoção das células livres. Após secagem das placas à TA, as células bacterianas e biofilme foram fixados com 200 μ L de etanol 75% por 10 minutos, e novamente secos à TA, seguido por coloração com 200 μ L de safranina 0,1% por 15 minutos. Após lavagem por quatro vezes com água destilada e secagem da placa à TA, o corante foi solubilizado com 100 μ L de etanol a 97% em éter (v/v) e o volume do poço completado com 100 μ L de PBS 0,2M pH 7,2.

Em cada placa, as amostras foram testadas em triplicata, incluindo a cepa de DAEC C1845, a cepa EAEC042 (controle positivo), DH5 α (controle negativo) e o controle branco (salina). Cada ensaio foi repetido por pelo menos duas vezes. A formação de biofilme foi detectada pela leitura da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 490 nm em leitor de ELISA Thermoplate TP READER®. A média (X) dos três valores de DO de cada amostra foi calculada, e valores de DO que divergiam em mais de 20% da média foram desconsiderados. Em cada placa foram calculados a média de DO (X_{CN}) e o desvio padrão (DP) dos controles negativos, e as amostras que obtiveram X menor e maior que $X_{CN} + 3.DP$ foram consideradas não formadoras e formadoras de biofilme, respectivamente (STEPANOVIC et al., 2007).

4.3.2 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA) foi realizado pelo método de difusão de disco (Kirby-Bauer), de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2012, frente a 13 antimicrobianos (ampicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulânico, ceftriaxona, cefepima, cefoxitina, aztreonam, imipenem, cirpofloxacina, amicacina, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina), conforme brevemente descrito a seguir. Suspensões bacterianas em concentração $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, conforme escala 0,5 de McFarland, foram semeadas em ágar Mueller-Hinton com auxílio de um *swab* estéril, em três direções, e as placas foram incubadas a 35°C, entre 16 e 18 horas. O diâmetro do halo de inibição foi medido com auxílio de luz transmitida e as bactérias classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes, conforme CLSI (2012). Amostras foram classificadas como multidroga-resistentes (MDR), conforme proposto por Magiorakos et al. (2012), quando apresentavam perfil de resistência ou intermediário a pelo menos um antimicrobiano de três classes distintas.

4.3.3 Sorologia

O ensaio de sorologia foi realizado em 50% (35/70) das amostras de DAEC, com 23 antissoros monovalentes para os seguintes antígenos: O26, O28, O29, O55, O86, O111, O112, O114, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O136, O142, O143, O144, O152, O157, O158, O164, O167 conforme instruções do fabricante (Probac do Brasil®).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram inseridos no programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0. A análise estatística foi realizada usando o teste de

probabilidade exato de Fisher e Qui quadrado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (intervalo de confiança de 95%).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

5.1.1 Descrição dos genes pesquisados entre os isolados de DAEC

As frequências dos genes pesquisados nas amostras de DAEC entre os isolados de crianças com e sem diarreia podem ser observadas na Tabela 1.

Dentre eles, alguns são característicos dos patótipos EAEC e/ou UPEC, sendo observado: (i) genes *fimH* (92,9%), *papC* (8,6%) e *sfa* (2,9%), que codificam adesinas de UPEC; (ii) ausência de genes que codificam adesinas de EAEC (*aggA*, *aafA* e *agg3A*); (iii) genes *sat* (28,6%) e *hly* (5,7%), que codificam toxinas de UPEC; (iv) genes *pet* (35,7%), *astA* (14,3%) e *set1A* (4,3%), que codificam toxinas de EAEC e; (v) *agn43* (57,1%), que codifica proteína agregativa, característico de EAEC e UPEC (Tabela 1).

Os genes foram reunidos conforme a função do produto codificado, em três grupos: (i) adesinas (exceto *fimH*), (ii) toxinas e (iii) proteínas captadoras/receptor de ferro (Tabela 2). Considerando a presença de pelo menos um gene de cada grupo entre os isolados de crianças com e sem diarreia, nenhum foi estatisticamente associado aos isolados de crianças com diarreia ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 1 – Frequência dos genes pesquisados nas 70 amostras de DAEC

Produto codificado pelo grupo de genes	Genes	Diarréia* N=23 n (%)	Controle* N=47 n (%)	Total n (%)
Adesinas	<i>fimH</i>	22 (95,7)	43 (91,5)	65 (92,9)
	<i>afaC</i>	11 (47,8)	23 (48,9)	34 (48,6)
	<i>papC</i>	3 (13)	3 (6,4)	6 (8,6)
	<i>sfa</i>	1 (4,3)	1 (2,1)	2 (2,9)
	<i>aida/aah</i>	1 (4,3)	0	1 (1,4)
	<i>aggA/ aafA/ agg3A</i>	0	0	0
Toxinas	<i>pet</i>	7 (30,4)	18 (38,3)	25 (35,7)
	<i>sat</i>	7 (30,4)	13 (27,7)	20 (28,6)
	<i>astA</i>	4 (17,4)	6 (12,8)	10 (14,3)
	<i>hlyA</i>	2 (8,7)	2 (4,3)	4 (5,7)
	<i>set1A</i>	0	3 (6,4)	3 (4,3)
Proteínas captadoras/receptor Fe	<i>irp2</i>	16 (69,6)	35 (74,5)	51 (72,9)
	<i>iucA</i>	13 (56,5)	24 (51,1)	37 (52,9)
	<i>chuA/shuA</i>	12 (52,2)	24 (51,1)	36 (51,4)
Outros	<i>daaD</i>	11 (47,8)	23 (48,9)	34 (48,6)
	<i>agn43</i>	12 (52,2)	28 (59,6)	40 (57,1)

* p>0,05

Tabela 2 – Amostras positivas para pelo menos um gene de cada grupo de gene, isoladas de crianças com e sem diarreia

Grupo de genes	Amostras*		
	Diarreia N=23 n (%)	Sem diarreia N=47 n (%)	Total N=70 n (%)
Adesinas	15 (65,2)	26 (55,3)	41 (58,6)
Toxinas	13 (56,5)	23 (48,9)	36 (51,4)
Proteínas captadoras/receptor Fe	18 (78,3)	38 (80,9)	56 (80)

*p>0,05

As amostras de DAEC apresentaram variadas combinações para os genes pesquisados, com destaque para 12 amostras positivas para dez genes e com mesmo perfil genotípico (Quadro 6).

Quadro 6 - Repertório de genes de virulência nas amostras de DAEC (n=70)

Q ^{dade} amostras	<i>fimH</i>	<i>afa</i>	<i>papC</i>	<i>sfa</i>	<i>aidA/aah</i>	<i>pet</i>	<i>astA</i>	<i>set1A</i>	<i>sat</i>	<i>hlyA</i>	<i>irp2</i>	<i>iucA</i>	<i>chuA/shuA</i>	<i>daaD</i>	<i>agn43</i>	Sorologia*
8	■															O125; O?; NT (6)
2	■												■			O?; NT
2	■										■					O124; O?
2	■						■									O128; O?
2	■														■	O119; O?
1	■				■											O?
3	■						■						■			O29; O?; NT
2	■										■				■	O?; NT
1	■						■									O125
1	■					■										NT
1		■									■		■			NT
1	■		■								■		■			NT
1	■								■				■			NT
1	■					■									■	O?
2	■					■						■				O127 (2)
1	■					■		■								O125
2	■		■										■			NT (2)
1	■		■									■		■		O?
1	■					■						■				NT
4	■		■											■		O86; O? ; NT (2)
1	■						■									NT
1	■								■							NT
1	■					■						■		■		NT
1	■		■												■	O?
8	■												■			O86; O? ; NT (6)
1	■					■			■			■				NT
2	■							■					■			O?; NT
1	■		■							■						NT
1	■		■							■						NT
12	■						■									O86 (5); O? (5) ; NT (2)
1	■						■									NT
1	■		■											■		NT

*NT= não testado

5.1.2 Caracterização de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr

Considerando as amostras que foram positivas por PCR para gene *afaC* e/ou por hibridização de colônias com sonda *afaBC* previamente realizado (Figura 8), 50% (35/70) das amostras foram classificadas como DAEC Afa/Dr. Dentre as amostras positivas para *afaC* (n=34, Tabela 1), 30 foram positivas através de ensaio de hibridização de colônia com sonda *afaBC* (LOZER et al., 2013; SOUZA et al., 2013) (Figura 8).

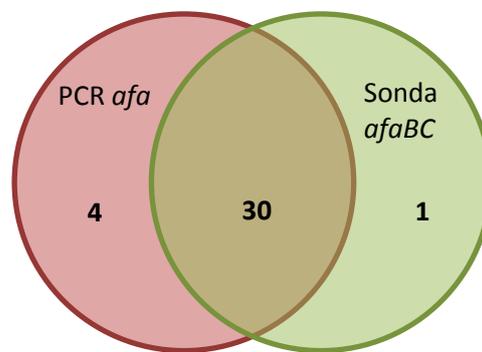


Figura 8 - Relação dos resultados entre sonda *afaBC* e PCR *afa/daaD*.

O gene *daaD* detectou todas as mesmas amostras de DAEC Afa/Dr que foram positivas para o gene *afa* (n=34). Produtos de amplificação do gene *daaD*, cujo *primer* foi desenhado para este estudo, pode ser visualizado na Figura 5.

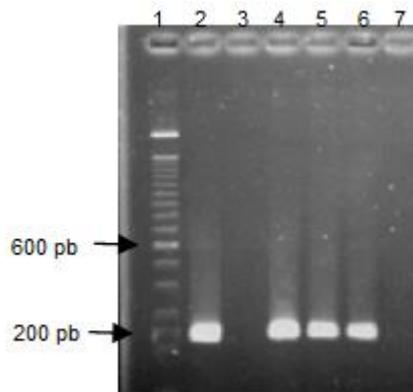


Figura 5 – Gel de agarose com fragmentos de DNA amplificados do gene *daaD* (estabelecido neste estudo) e corado com brometo de etídio. Linha 1: padrão de peso molecular de 100 pb; linhas 2, 4, 5 e 6: amostras positivas (245 pb); linha 3: amostra negativa; linha 7: controle negativo.

A distribuição dos genes pesquisados entre os isolados de DAEC revelou que *pet*, *sat*, *ipr2*, *iucA*, *chuA/shuA* e *agn43* foram significantes nas amostras de DAEC Afa/Dr ($p \leq 0,004$) (Tabela 3).

Considerando o número total de genes por amostra, 71,4% das DAEC Afa/Dr foram positivas para sete ou mais genes e nenhuma apresentou menos de quatro genes, enquanto que 68,6% das amostras de DAEC não Afa/Dr foi positiva para até três genes (Tabela 4).

Tabela 3 – Distribuição dos genes em amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr

Função de genes	Genes	DAEC Afa/Dr*		Valor de p
		Sim n (%)	Não n (%)	
Adesinas	<i>fimH</i>	30 (85,7)	35 (100)	>0,05
	<i>papC</i>	0	6 (17,1)	ND
	<i>sfa</i>	0	2 (5,7)	ND
	<i>aidA/aah</i>	0	1 (2,9)	ND
	<i>aggA/aafA/agg3A</i>	0	0	ND
Toxinas	<i>pet</i>	18 (51,4)	7 (20)	0,006
	<i>sat</i>	17 (48,6)	3 (8,6)	0,000
	<i>astA</i>	2 (5,7)	8 (22,9)	ND
	<i>hlyA</i>	1 (2,9)	3 (8,6)	ND
	<i>set1A</i>	2 (5,7)	1 (2,9)	ND
Proteínas captadoras/receptor Fe	<i>irp2</i>	35 (100)	16 (45,7)	0,000
	<i>iucA</i>	29 (82,9)	8 (22,9)	0,000
	<i>chuA/shuA</i>	24 (68,6)	12 (34,3)	0,004
Outros	<i>daaD</i>	23 (100)	0	ND
	<i>ang43</i>	33 (94,3)	7 (20)	0,000

*DAEC Afa/Dr (n=35) e não Afa/Dr (n=35)

Tabela 4 – Número total de genes positivos encontrados por amostra nas DAEC Afa/Dr e DAEC não Afa/Dr.

Total de genes por amostra	DAEC Afa/Dr N=35 n (%)	DAEC não Afa/Dr N=35 n (%)
1 a 3	0	24 (68,6)
4 a 6	10 (28,6)	9 (25,7)
>7	25 (71,4)	2 (5,7)

As amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr apresentaram 13 e 19 perfis genotípicos distintos (Quadros 7 e 8). Todas as 12 amostras de DAEC que apresentaram o mesmo repertório de genes corresponderam à DAEC Afa/Dr (Quadro 7).

5.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

5.2.1 Formação de biofilme em superfície abiótica

O ensaio de biofilme revelou 44,3% (31/70) e 55,7% (39/70) do total das amostras de DAEC como formadoras e não formadoras de biofilme, respectivamente (Figura 6). Das 31 amostras formadoras de biofilme, 15 e 16 foram DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr, respectivamente. A relação entre a presença de genes previamente descritos como relacionados com formação de biofilme (*aida/aah*, *fimH*, *papC*, *sfa* e *agn43*) ou possivelmente relacionado (*afa*) não foi significativa ($p > 0,05$) (Tabela 5).

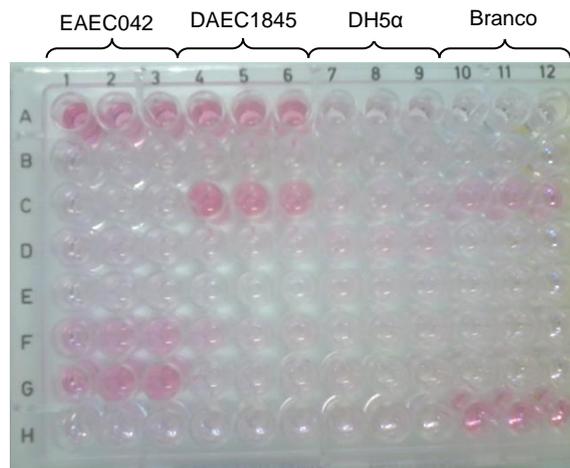


Figura 6 – Microplaca de poliestireno para ensaio de formação de biofilme mostrando diferentes intensidades de cor entre amostras aplicadas em triplicata. Os controles positivos (EAEC042/DAEC1845) e negativo (DH5α) e branco (sem amostra) foram aplicados nos poços na linha A; os demais poços receberam as amostras de DAEC.

Tabela 5 – Relação entre a produção de biofilme e a presença de genes associados com aderência bacteriana.

Genes de aderência	Biofilme*	
	Produtor N=31 n (%)	Não Produtor N=39 n (%)
<i>agn43</i>	21 (67,4)	19 (48,7)
<i>aida/aah</i>	0	1 (2,6)
<i>fimH</i>	29 (93,5)	36 (92,3)
<i>afa</i>	15 (48,4)	19 (48,7)
<i>papC</i>	3 (9,7)	3 (7,7)
<i>sfa</i>	2 (6,5)	0

* $p > 0,05$ para todos os genes

5.2.2 Determinação de sorogrupos

Dos 23 sorogrupos pesquisados nas 35 amostras de DAEC, foram observados: um O29, dois O125, dois O127, sete O86 e 11 não determinados (Quadro 6).

5.2.3 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

As amostras foram classificadas como resistentes, intermediárias ou sensíveis para cada um dos 13 antimicrobianos testados, de acordo com CLSI 2012 (Gráfico 1). Um total de 31,4% (22/70) foi sensível a todas as drogas, enquanto que 68,6% (48/70) foram resistentes ou intermediárias (R/I) a pelo menos uma das drogas testadas. Maior frequência de resistência foi encontrada para ampicilina (55,7%), seguida de sulfametoxazol/trimetoprim (35,7%) e de tetraciclina (28,6%).

As amostras S e R/I (a pelo menos uma droga) foram encontradas entre as DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr em 5,7% (2/35) e 94,3% (33/35) e em 57,1% (20/35) e 42,9% (15/35), respectivamente. As frequências de R/I e S para as amostras de DAEC Afa/Dr estão apresentadas na Tabela 6. As amostras de DAEC Afa/Dr apresentaram maiores frequências de R/I para todos antimicrobianos, quando comparado com as amostras de DAEC não Afa/Dr, exceto para imipenem. R/I para amoxicilina/ác.

clavulânico ($p=0,002$), ampicilina ($p=0,000$) e sulfametoxazol/trimetoprim ($p=0,000$) foi significativa nas amostras de DAEC Afa/Dr.

Foram classificadas como multidroga-resistentes (MDR), conforme critérios estabelecidos por Magiorakos et al. (2012), 62,9% (22/35) e 5,7% (2/35) das amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr, respectivamente ($p=0,000$).

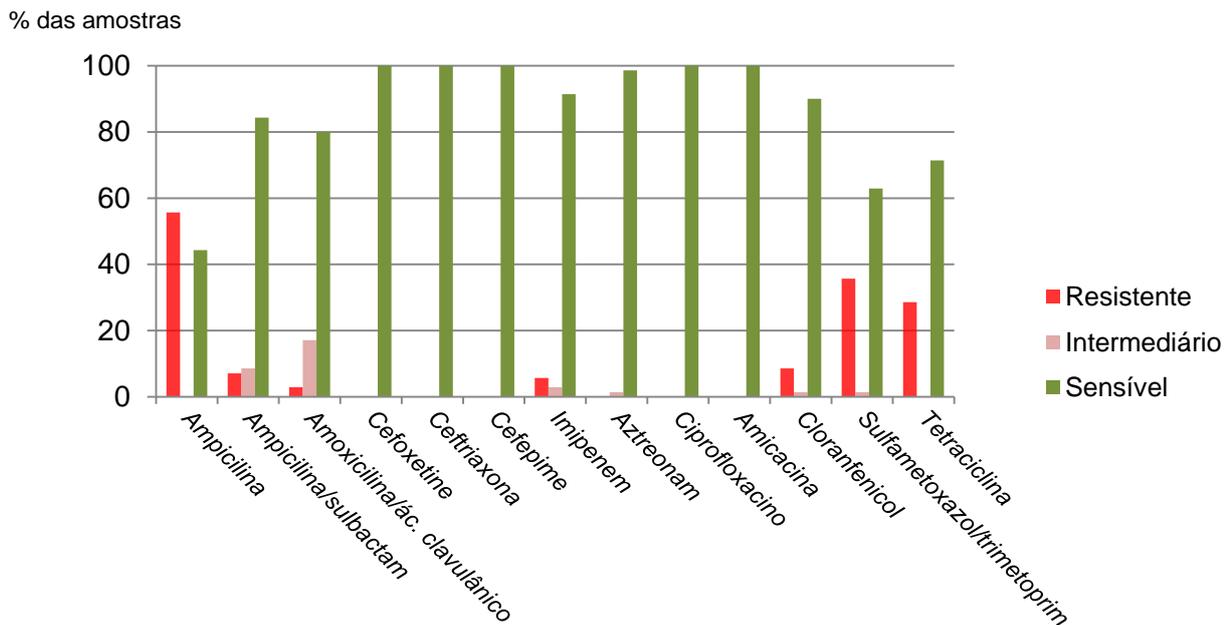


Gráfico 1 – Resultado do teste de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão do disco para as 70 amostras de DAEC.

Tabela 6 – Frequência de R/I em amostras de DAEC Afa/Dr (n=35) e não Afa/Dr (n=35)

Antimicrobianos	DAEC Afa/Dr		Valor de p
	Sim	Não	
Ampicilina	31 (88,6)	8 (22,9)	0,000
Ampicilina/sulbactam	8 (22,8)	3 (8,6)	>0,05
Amoxicilina/ác. clavulânico	13 (37,1)	1 (2,9)	0,002
Cefoxitina	0	3 (8,6)	ND
Ceftriaxona	0	0	ND
Cefepima	0	0	ND
Imipenem	3 (8,6)	3 (8,6)	ND
Aztreonam	1 (2,9)	0	ND
Ciprofoxacino	0	0	ND
Amicacina	0	0	ND
Cloranfenicol	6 (17,1)	1 (2,9)	ND
Sulfametoxazol/trimetoprim	21 (60)	5 (14,3)	0,000
Tetraciclina	13 (37,1)	7 (20)	>0,05

ND: Não determinado.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados 70 isolados de DAEC através de métodos genotípicos e fenotípicos cujos resultados serão discutidos no contexto do total das amostras assim como, entre aquelas que foram classificadas como DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr.

6.1 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

6.1.1 Do total de amostras de DAEC

Nas amostras de DAEC foram pesquisados 18 genes possíveis de atuarem como fatores de virulência. Dentre esses genes, oito codificam adesinas, cinco codificam toxinas, três codificam proteínas captadoras/receptora de ferro, um a invasina e um, a proteína de agregação bacteriana (Tabela 1).

Dentre os genes que codificam adesinas, o gene *fimH* foi o mais prevalente. De acordo com nosso conhecimento, há apenas uma descrição de *fimH* em DAEC e esta, em amostras brasileira (LOPES et al, 2005), que apresentou frequência bem menor (48%) do que a apresentada pelo presente estudo. Por outro lado, o gene *afaC*, que identifica amostras portadoras de operons das adesinas Afa/Dr, foi encontrado em frequência similar à de outros estudos, seja por PCR ou por sonda, que demonstraram frequências que variam entre 15 e 60% (GIRON et al., 1991; JALLAT et al., 1993, 1994; POITRINEAU et al., 1995; GERMANI et al., 1996; FORESTIER et al., 1996; GOMES et al., 1998; SCALETISKY et al., 2002a, 2002b; LOPES et al., 2005; MERAZ et al., 2007). As adesinas Afa/Dr são descritas como fatores de virulência e são frequentemente encontradas em amostras de *E. coli* isoladas de crianças (GERMANI et al., 1996; SERVIN, 2005).

Os genes que codificam as fímbria P e S, *papC* e *sfa*, respectivamente, foram encontrados em frequências similares à encontrada por Lopes et al. (2005), de 5,3% e de 2,7%, respectivamente. Nenhum outro estudo descreveu estas fímbrias em isolados clínicos de DAEC.

O gene *aidA/aah* foi encontrado em somente uma amostra (1,4%), corroborando outros estudos que mostram a frequência variando entre zero e

4% quando pesquisado somente o gene *aida* (JALLAT et al., 1993, 1994; GERMANI et al., 1996; SCALETISKY et al., 2002a, 2002b). O *primer* utilizado no presente estudo, *aidA/aah*, identifica a presença de *aidA* e de *aah*, e eventuais amostras positivas para *aidA* e negativas para *aah* não são identificadas (BERTHIAUME et al, 2010). Destaca-se que ambos os genes são indispensáveis para função adesina de AIDA-I (BENZ, SCHMIDT, 1992, 2001; LAARMANN, SCHMIDT, 2003).

Nenhuma amostra foi positiva para os genes que codificam as fímbrias de aderência agregativa, *aggA*, *aafA* e *agg3A*, considerados membros distantes das adesinas Afa/Dr (CZECZULIN et al., 1999; KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004; SERVIN, 2005). Os genes *aggA* e *agg3A* foram descritos em amostras de DAEC por Lopes et al. (2005), com frequências de 0,9% e 17,8%, respectivamente.

No presente estudo, *pet* foi o mais frequente dentre aqueles que codificam toxinas e encontrado em alta frequência (35,7%), quando comparada à única descrição em amostras de DAEC, na qual 112 amostras foram negativas para tal gene (LOPES et al., 2005). Esses dados destacam a divergência entre as amostras de DAEC assim como enfatiza o perfil heterogêneo do patotipo.

O gene *sat* apresentou frequência similar (28,6%) àquelas descritas em outros estudos, que variam entre 30 e 44% (TADDEI et al., 2003; GUIGNOT et al., 2007; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013). Este gene, presente inclusive na cepa de DAEC C1845, foi relacionado com amostras de DAEC Afa/Dr isoladas de crianças com diarreia (TADDEI et al., 2003; GUIGNTO et al., 2007; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013). Os genes *astA*, *set1A* e *hlyA* apresentaram frequências também similares àquelas encontradas em outros estudos (JALLAT et al., 1993; LOPES et al., 2005).

Os genes que codificam as proteínas captadoras/receptora de ferro foram comuns entre as amostras, sendo *irp2* o mais frequente (72,9%), seguido de *iucA* (52,9%) e *chuA/shuA* (51,4%). Czeczulin et al. (1999) mostraram *irp2* característico de DAEC e EAEC, com frequência de 50% nas DAEC. Os genes *iucA* e *chuA/shuA* foram descritos na cepa C1845 por Blanc-Portard et al.

(2002), contudo apenas *iucA* foi pesquisado em isolados de DAEC, com frequência de 50%, similar ao presente estudo (LOPES et al., 2005).

O gene *daaD* foi encontrado em aproximadamente metade das amostras de DAEC (48,6%). Apesar de *daaD* não ter sido relacionado com amostras isoladas de crianças com diarreia, estudos tem evidenciado a importância da invasina *daaD* em mediar a internalização bacteriana em células hospedeiras, e assim colaborar com a persistência da infecção (JOUVE et al., 1997; GARCIA et al., 1996, 2000; GOUNON, JOUVE, LE BOUGUENEC, 2000).

O gene *agn43*, até então não pesquisado em isolados de DAEC, foi encontrado em um pouco mais da metade das amostras (57,1%) e também na cepa protótipo C1845. Este gene foi descrito em outros patótipos de *E. coli*, como em EAEC, UPEC e na cepa de *E. coli* comensal K-12 (HENDERSON, MEECHAN, OWEN, 1997; ROCHE, MCFADDEN, OWEN, 2001). Está relacionado com a agregação bacteriana e com a formação de biofilme por UPEC e EAEC (HASMAN, CHAKRABORTY, KLEMM, 1999; SCHEMBRI, KJÆRGAARD, KLEMM, 2003; KLEMM et al., 2004; SHERLOCK et al., 2006; ULETT et al., 2007) e será abordado posteriormente.

Dentre os genes pesquisados, alguns são característicos de EAEC e/ou de UPEC. A EAEC é caracterizada pela sua enorme heterogeneidade e, assim como DAEC, é identificada através de ensaio de aderência em cultura de células (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). A UPEC frequentemente expressa adesinas Afa/Dr, responsável pelo fenótipo DA e possivelmente relacionadas a casos de cistite em crianças e de UTI recorrente ou crônica (ARCHAMBAUD, COURCOUX, LABIGNE-ROUSSEL, 1988; DAIGLE et al., 1994; D'ORAZIO, COLLINS, 1998; FOXMAN et al., 1995; NOWICKI, SELVARANGAN, NOWICKI, 2001). Dentre os genes característicos de EAEC (*pet*, *astA*, *set1A*, *aggA*, *aafA* e *agg3A*), destaca-se a alta frequência de *pet* (35,7%) nas DAEC, similar às encontradas em EAEC (OKEKE et al., 2000; KHALI et al., 2004; ZAMBONI et al., 2004; MOON et al., 2005; MOHAMED et al., 2007; HUANG et al., 2007; MORENO et al., 2010; TOKUDA et al., 2010). Porém, os genes *astA* e *set1A* foram encontrados em frequências menores do que aquelas descritas em EAEC (SUZART et al., 2001; ZAMBONI et al., 2004; ARAUJO et al., 2007; MENDEZ-ARANCIBIA et al., 2008; REGUA-MANGIA et

al., 2009; MORENO et al., 2010; TOKUDA et al., 2010; ASLANI et al., 2011). Os genes *aggA*, *aafA* e *agg3A* não foram encontrados nas amostras de DAEC. Dentre os genes característicos de UPEC (*fimH*, *papC*, *sfa*, *sat* e *hlyA*), *fimH* estava presente na quase totalidade das amostras, similar ao descrito para UPEC (CONNELL et al., 1996; SOKURENKO et al., 1998; GUYER et al., 2000; JOHNSON, STELL, 2000; TARTOF et al., 2007; KARAN et al., 2012). Os genes *papC*, *sfa* e *hlyA* apresentaram frequências menores do que aquelas encontradas em UPEC (LE BOUGUENEC, ARCHAMBAUD, LABGNE, 1992; KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004; ONG et al., 2008). Ainda, o *agn43*, característico de EAEC e UPEC, foi encontrado em mais da metade das amostras (HENDERSON, MEECHAN, OWEN, 1997; ANDERSON et al., 2003; ULETT et al., 2007; MENDEZ-ARANCIBIA et al., 2008). Esses dados destacam a frequência de *pet* similar à encontrada em EAEC, de *fimH* similar à encontrada em UPEC, e de *agn43* similar à EAEC e UPEC.

Os genes pesquisados foram distribuídos em cinco grupos, de acordo com a função do produto codificado, e a presença de pelo menos um gene de cada grupo foi analisado nas amostras de DAEC. No grupo das adesinas, *fimH* foi excluído desta análise por ter sido encontrado em mais de 90% das amostras. O grupo das proteínas captadoras/receptora de ferro foi amplamente distribuído nas amostras de DAEC (80%), o que parece indicar que sistemas de transporte de ferro são característicos de DAEC, assim como é de EAEC (OKEKE et al., 2004). Os grupos das adesinas e das toxinas apresentaram frequências menores, embora tenham sido encontrados em mais da metade das amostras. Apesar dos grupos de genes terem sido similarmente distribuídos entre amostras isoladas de crianças com e sem diarreia ($p > 0,05$), a presença de tais genes pode capacitar a colonização bacteriana no epitélio intestinal, ativar a resposta imune e causar danos ao hospedeiro (FASANO et al., 1995; SOTO, HULTGREN, 1999; SERVIN, 2005; LOPES et al., 2005; GUIGNOT et al., 2007; ONG et al., 2008).

As amostras de DAEC apresentaram variado perfil genotípico, com até dez genes por amostra. Destaca-se, além da frequente presença de genes que codificam proteínas captadoras/receptora de ferro e de *fimH*, já citado

anteriormente, 12 amostras positivas com o mesmo repertório de nove genes, classificadas como DAEC Afa/Dr, que serão abordadas adiante.

Apesar das amostras terem sido associadas à diarreia na população de crianças quilombolas e de periferia urbana, nenhum gene pesquisado foi relacionado ao potencial diarreiogênico. É possível que outros genes, não pesquisados ou não conhecidos, estejam envolvidos com a virulência dessas amostras, sozinhos ou em conjunto com os genes pesquisados no presente estudo. Essa hipótese é reforçada pelo fato de aproximadamente metade das amostras possuírem o padrão DA em cultura de células, contudo as estruturas responsáveis por esse fenótipo não são conhecidas.

Nas DAEC, grande parte dos estudos está relacionada com a pesquisa de genes que codificam adesinas Afa/Dr e poucos descreveram o perfil genotípico de amostras de DAEC através da pesquisa de no máximo 13 genes (GIRON et al., 1991; JALLAT et al., 1993, 1994; POITRINEAU et al., 1995; FORESTIER et al., 1996; BLANC-POTARD et al., 2002; SCALETISKY et al., 2002a; LOPES et al., 2005; MERAZ et al., 2007; GUIGNOT et al., 2007; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013), contrastando com o presente estudo, que pesquisou 18 genes. Portanto, a carência de trabalhos que descrevem variados genes possíveis de atuarem como fatores de virulência em amostras de DAEC tem dificultado traçar um perfil característico do patótipo, ou então identificar uma subpopulação com maior virulência.

6.1.2 Das amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr

As amostras de DAEC foram classificadas em dois grupos, DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr, de acordo com a presença e ausência de operons que codificam adesinas Afa/Dr, respectivamente, conforme previamente descrito (SERVIN, 2005). Foi utilizado o par de *primer afaC* descritos por Le Bouguenec et al. (2001), a fim de identificar amostras de DAEC positivas para adesinas Afa/Dr⁺ e Afa/Dr⁻. Este par de *primer* foi baseado nos operons *afa-3*, *afa-7* e *afa-8*, e flanqueia um segmento interno do gene *afaC* (LE BOUGUENEC et al., 2001). O método de PCR detectou maior número de amostras positivas para os operons da família Afa/Dr, quando comparado ao ensaio de hibridização com

sonda *afaBC* (34 versus 31 amostras), previamente revelado (Figura 8). A sonda *afaBC*, proposta por Labigne-Roussel, Falkow (1988), flanqueia um segmento interno entre os genes *afaB* e *afaC*, baseado no operon *afa-1*, e identifica os operons que codificam adesinas Afa/Dr⁺ (LABIGNE-ROUSSEL, FALKOW, 1988; LE BOUGUENEC ARCHAMBAUD, LABGNE, 1992; LE BOUGUENEC et al., 2001; LE BOUGUENEC, SERVIN, 2006). Somente uma amostra positiva para a sonda *afaBC* foi negativa para o *primer afaC*, o que pode ser devido à mutação pontual no gene *afaC*. É possível que as três amostras positivas somente para *afaC* portem os operons *afa-7* ou *afa-8*, que codificam adesinas Afa/Dr⁻, não identificadas pela sonda. Porém, o operon *afa-7*, descrito em amostras de DAEC isoladas de animais com diarreia, não foi, até o momento, identificado em isolados de humanos (LALIOUI et al., 1999; LE BOUGUENEC et al., 2001; SERVIN, 2005). Da mesma forma, o operon *afa-8* foi associado a amostras isoladas de infecções extraintestinais e raramente encontrado em isolados fecais de indivíduos saudáveis, ainda não associado à diarreia (LALIOUI et al., 1999; GERARDIN et al., 2000, 2003; LE BOUGUENEC et al., 2001; LALIOUI, LE BOUGUENEC, 2001; SERVIN 2005)..

Todas as amostras positivas para *afaC* foram também para *daaD*, e vice-versa, possivelmente devido ao fato de ambas comporem os operons das adesinas Afa/Dr e serem altamente conservadas entre os membros (LE BOUGUENEC et al., 1992; SERVIN, 2005). Esses resultados indicam que tanto o *primer daaD* quanto o *afaC* são capazes de identificar os operons que codificam as adesinas Afa/Dr, inclusive os subtipos *afa-7* e *afa-8* (identificação de Afa/Dr⁺ e Afa/Dr⁻), não identificados pelo par de *primer afa1/afa2* ou pela sonda *afaBC*.

Os genes *pet*, *sat*, *irp2*, *iucA*, *chuA/shuA* e *agn43* foram estatisticamente relacionados com amostras de DAEC Afa/Dr. Trata-se do primeiro estudo a evidenciar esta associação, com exceção de *sat* (TADDEI et al., 2003; GUIGNOT et al., 2007). É, portanto, possível que tais genes atuem como fatores de virulência em amostras de DAEC Afa/Dr, juntamente com as adesinas Afa/Dr.

A análise do repertório de genes entre as amostras de DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr mostrou que esses grupos apresentam um perfil genético diferenciado entre si, com as Afa/Dr apresentando menor número de perfis genotípicos

(n=13) com maior número de genes do que as não Afa/Dr (n=19), com maior número de perfis e menor número de genes. Salienta-se que a maior parte das primeiras (71,4%) possui pelo menos sete dos 18 genes pesquisados, enquanto que as não Afa/Dr (68,6%), no máximo três genes. É ainda digno o nota o achado de duas sub-populações principais de DAEC Afa/Dr com o mesmo perfil genético (12 amostras com oito genes e oito amostras com seis genes). Dentre as não Afa/Dr, houve uma sub-população predominante, constituída por oito amostras positivas somente para *fimH*, mostrando uma maior heterogeneidade entre estas e contendo poucos dos genes pesquisados por amostra.

Esses resultados sugerem uma aparente maior conservação e um maior potencial virulento entre os isolados de DAEC Afa/Dr, apesar de não terem sido relacionadas à diarreia na população estudada (dados não mostrados). Estes resultados apontam para a necessidade de estudos com um maior número de amostras, sendo esta, uma limitação deste estudo.

6.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

6.2.1 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica

Aproximadamente metade das amostras de DAEC (47,8%) foi classificada como formadora de biofilme, frequência bem superior ao único e recém-descrito estudo realizado por Mansan-Almeida, Pereira, Giugliano (2013) que encontraram 11% (12/108) e 26,2% (11/42) de formação de biofilme em amostras de DAEC Afa/Dr isoladas de crianças com até cinco anos e de adultos, respectivamente

É interessante observar que igual metodologia foi utilizada para formação de biofilme no presente estudo e por Mansan-Almeida, Pereira, Giugliano (2013), diferindo apenas no volume de suspensão de uma mesma concentração bacteriana adicionada aos poços (2 e 5 μ L, respectivamente) e no corante usado (safranina e cristal violeta, respectivamente). A menor concentração bacteriana utilizado pelo presente estudo não justificaria a diferença entre os

resultados encontrados. O estudo realizado por Monfardini (2012) comparou diferenças entre os corantes cristal violeta e safranina nos resultados de formação de biofilme em amostras de EAEC, e revelou uma frequência discretamente maior em amostras coradas com safranina, quando comparada ao cristal violeta (30,7% versus 24,9%). Esta diferença é significativamente menor do que as frequências de formação de biofilme apresentada por ambos os estudos. Portanto, é possível que a divergência entre as frequências de formação de biofilme seja, na realidade, devido às diferentes origens dessas amostras, norte do Espírito Santo e de Brasília.

A maior parte das amostras produtoras de biofilme (60%) foi isolada de crianças com diarreia, embora não tenha sido estatisticamente significativo. A formação de biofilme é um mecanismo de virulência bem descrito para isolados de EAEC, associada à infecção persistente, à resistência à ação de antimicrobianos, e à resposta imunológica do hospedeiro, à redução da absorção de nutrientes com agravamento de deficiência nutricional e retardo no desenvolvimento infantil (NATARO et al., 1996; NATARO, KAPER, 1998; STEINER et al., 1998; HUANG et al., 2006; MOHAMED et al., 2007). Apesar deste mecanismo para DAEC não ser estabelecido, a capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica sugere que o mesmo poderia também ocorrer no epitélio intestinal. Certamente, mais estudos são necessários para se inferir o potencial patogênico de amostras de DAEC formadoras de biofilme, já que a capacidade de agregação bacteriana é considerada um importante mecanismo de virulência (MENDEZ-ARANCIBIA et al., 2008).

Diversos genes tem sido relacionados com produção de biofilme em amostras de EAEC e UPEC, ou em amostras recombinantes de *E. coli* (NATARO et al., 1992; CZEZULIN et al., 1997; PRATT, KOLTER, 1998; SHEIKH et al., 2001; SHERLOCH et al., 2006; GIRARD et al., 2010), e dentre esses, o *agn43*, *aidA*, *fimH*, *aggA*, *aafA* e *agg3A* foram pesquisados nas amostras de DAEC do presente estudo.

Apesar de diversos estudos descreverem a função do Agn43 na formação do biofilme (HASMAN, CHAKRABORTY, KLEMM, 1999; SCHEMBRI, KJÆRGAARD, KLEMM, 2003; KLEMM et al., 2004; SHERLOCK et al., 2006; ULETT et al., 2007) e a maior parte das amostras formadoras terem sido

positivas (67,7% versus 48,7%), este gene não foi significativo entre elas. É possível que a expressão de FimH, cujo gene foi encontrado em 90% das amostras *agn43* positivas não formadoras de biofilme, tenha impossibilitado a interação Agn43-Agn43, fenômeno previamente descrito (SHERLOCK et al., 2004; ULETT et al., 2007).

A adesina AIDA-I foi descrita ser capaz de formar agregados bacterianos e biofilme com eficiência superior à de Agn43 em mutantes de *E. coli* (SHERLOCK et al., 2004; GIRARD et al., 2010). Porém, das amostras de DAEC analisadas nesse estudo, apenas uma foi positiva para o gene que codifica AIDA-I, e essa foi não produtora de biofilme, o que pode ser também devido ao à expressão concomitante da fímbria tipo 1, que impede a interação AIDA-AIDA (SHERLOCK et al., 2004; ULETT et al., 2007).

Alguns estudos mostraram que a fímbria tipo 1 pode estar relacionada com a formação de biofilme em *E. coli*, apesar de ser amplamente encontrada em cepas comensais (PRATT, KOLTER, 1998; DANESE et al., 2000; SCHEMBRI, CHRISTIANSEN, KLEMM, 2001; SCHEMBRI, KLEMM, 2001; REISNER et al., 2003; SCHEMBRI, KJÆRGAARD, KLEMM, 2003; KLEMM et al., 2004). A adesina FimH, codificada pelo gene *fimH*, compõem a fímbria tipo 1 e é responsável pela ligação a receptores de células hospedeiras e a superfícies abióticas (KUKKONN, et al., 1993; SOKURENKO et al., 1994; PRATT, KOLTER, 1998; SCHEMBRI, KLEMM, 2001a). Neste estudo, *fimH* foi encontrado em frequência similar entre as amostras formadoras e não formadoras de biofilme ($p > 0,05$). Sheikh et al. (2001) analisaram a expressão da fímbria tipo 1 em amostras de EAEC e também não relacionaram essa fímbria com a formação de biofilme.

A presença dos genes que codificam adesinas *afa*, *papC* e *sfa*, também não foram relacionados com isolados formadores de biofilme ($p > 0,05$). Apesar de nenhum gene pesquisado ter sido relacionado com a formação de biofilme nas amostras estudadas, sabe-se que esse fenótipo é multifatorial. Sabe-se ainda que os genes *fimH* e *agn43* podem ter sua expressão aumentada quando em biofilme, e esse fato sugere uma real importância desses genes na gênese do biofilme nas amostras do presente estudo, já que foram encontrados em alta frequência (SCHEMBRI, KJÆRGAARD, KLEMM, 2003). Ainda, a fímbria tipo 1

pode sofrer variação de fase em resposta a sinais do ambiente, sendo esse outro fator que pode interferir no processo de formação de biofilme (FREITAG et al., 1985; KISIEKA et al., 2013).

6.2.2 Sorologia

Poucos estudos caracterizaram sorogrupos em DAEC, e a maior parte deles antecede a década de 90 (SCALETKY et al, 1985; NATARO et al., 1985; ECHEVERRIA et al., 1987; BENZ, SCHMIDT, 1987; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA, GIUGLIANO, 2013). As amostras testadas para os 23 sorogrupos apresentaram perfil a sete deles, com predomínio de O86 (7/16), mesmo sorogrupo mais frequente descrito nas amostras de DAEC por Mansan-Almeida, Pereira, Giugliano (2013). Vale ressaltar que todas as amostras pertencentes a este sorogrupo, foram classificadas como DAEC Afa/Dr, sugerindo uma possível relação entre eles.

6.2.3 Ensaio de suscetibilidade a antimicrobianos

Dentre os 13 antimicrobianos testados nas amostras de DAEC, todas foram sensíveis à ceftriaxona, cefepime, ciprofloxacino e amicacina. As maiores frequências de resistência foram encontradas para ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina, semelhantes ao observado em amostras de DAEC de hospitais brasileiros ou de comunidades periurbanas de baixo nível socioeconômico, e também descrito para outros patotipos de DEC (CALVA, SIFUENTES-OSORNIO, CERON, 1996; VILA et al., 1999; GIRARDEAU, et al., 2003; ESTRADA-GARCÍA et al., 2005; LOPES et al., 2005; BAILEY et al., 2010; OCHOA et al., 2009, 2010; SCALETSKY et al., 2010).

As frequências de resistência a ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina, observada nas DAEC do presente estudo que foram inferiores àquelas descritas por Ochoa et al. (2009), provavelmente devido ao fato de

terem sido provenientes de crianças que vivem em comunidades semi-isoladas, com acesso restrito a sistema de saúde e ao uso de antimicrobianos.

Merece destaque o fato das amostras de DAEC Afa/Dr apresentarem maiores frequências de R/I a todos os antimicrobianos, exceto para imipenem, quando comparado com as DAEC não Afa/Dr, sendo significativa para amoxicilina/ác. clavulânico, ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim, achado até então não descrito na literatura. Da mesma forma, trata-se da primeira descrição de perfil MDR significativa entre os isolados de DAEC Afa/Dr. Este achado pode ser devido ao fato de que os operons da família Afa/Dr podem ser transferidos juntamente com variados genes de resistência (LOPES et al., 2005). Apesar das amostras de DAEC Afa/Dr não terem sido associadas a crianças com diarreia, estas podem representar um importante reservatório de genes de resistência a antimicrobianos, além de diversos fatores de virulência.

7 CONCLUSÃO

- Dentre os genes que codificam adesinas, *fimH* foi predominante nas amostras de DAEC, e nenhum dos genes de aderência agregativa foi observada;
- Os genes *irp2*, *iucA* e *shuA/chuA*, que compõem o grupo das proteínas captadoras/receptora de ferro, foram comuns e parecem ser característicos no patotipo DAEC;
- Os genes *agn43* e *pet* foram descritos pela primeira vez em DAEC, mostrando alta frequência nessas amostras;
- Nenhum dos genes pesquisados foi associado aos isolados de crianças com diarreia;
- Dos genes característicos de EAEC ou de UPEC pesquisados em DAEC, *pet* e *fimH* foram encontrados em frequências similares a destes patotipos, respectivamente;
- Os genes *pet*, *irp2*, *iucA*, *shuA/chuA* e *agn43* foram observados, pela primeira vez serem significativos nas amostras de DAEC Afa/Dr;
- As DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr constituíram grupos com perfis genéticos diferenciado entre si, sendo as Afa/Dr com duas sub-populações principais com o mesmo perfil genético, e as não Afa/Dr, com uma sub-população predominante;
- Aproximadamente metade das amostras de DAEC foi classificada como formadora de biofilme, mostrando ser uma propriedade comum “*in vitro*”;
- Dos genes relacionados com a formação de biofilme, nenhum foi estatisticamente relacionado com os isolados formadores de biofilme;
- As frequências de resistência foram mais comuns para ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina;
- As baixas frequências de resistência a antimicrobianos sugerem que a população semi-isolada esteja sujeita a uma menor pressão seletiva;
- As DAEC Afa/Dr apresentaram maiores frequências de R/I do que as não Afa/Dr, com exceção do imipenem;
- Perfil de resistência/intermediário a amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim, e de MDR, foram significantes em amostras de DAEC Afa/Dr;

- As DAEC pertenceram a poucos sorogrupos, sendo o O86 o mais frequente e presente somente nas Afa/Dr, sugerindo uma possível relação entre eles.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. N.; BEACHEY, E. H. Assembly of a chemically synthesized peptide of *Escherichia coli* type q fimbriae into fimbria-like antigenic structures. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 6, p. 2460-2465, 1987.
- ALBERT, M. J.; FARUQUE, S. M.; FARUQUE, A. S. G.; NEOGI, P. K. B.; ANSARUZZAMAN, M.; BHUIYAN, N. A.; ALAM, K.; AKBAR, M. S. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 973–977, 1995.
- ALBERT, M. J.; FARUQUE, A. S. G.; FARUQUE, S. M.; SACK, R. B.; MAHALANABIS, D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3458–3464, 1999.
- ANDERSON, G. G.; PALERMO, J. J.; SCHILLING, J. D.; ROTH, R.; HEUSER, J.; HULTGREN, S. J. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. **Science**, 301, p. 105–107, 2003.
- ANDERSON, K. L.; BILLINGTON, J.; PETTIGREW, D.; COTA, E.; SIMPSON, P.; ROVERSI, P.; CHEN, H. A.; URVIL, P.; DU MERLE, L.; BARLOW, P. N.; MEDOF, M. E.; SMITH, R. A. G.; NOWICKI, B.; LE BOUGUENEC, C.; LEA, S. M.; MATTHEWS, S. An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesions. **Molecular Cell**, v. 15, p. 647–657, 2004.
- AHRENS, R.; OTIT, M.; RITTER, A.; HOSCHUTZKY, H.; BUHLER, T.; LOTTSPREICH, F.; BOULNOIS, G. J.; JANN, K.; HACKER, J. Genetic analysis of the gene cluster encoding nonfimbrial adhesin i from an *Escherichia coli* uropathogen. **Infection and immunity**, v. 61, n.6, p. 2505-2512, 1993.
- ARAUJO, J.M.; TABARELLI, G.F.; ARANDA, K.R.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDESNETO, U.; MENDES, C.M.; SCALETSKY, I.C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.
- ARCHAMBAUD, M.; COURCOUX, P.; LABIGNE-ROUSSEL, A. Detection by molecular hybridization of pap, afa, and sfa adherence systems in *Escherichia coli* strains associated with urinary and enteral infections. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, 139, p. 575–588, 1988.
- ARIKAWA; MERAZ, I.M.; NISHIKAWA, Y.; OGASAWARA, J.; HASE, A. Interleukin-8 secretion by epithelial cells infected with Diffusely Adherent *Escherichia coli* possessing Afa adhesin-coding genes. **Microbiol. Immunol.**, 49(6), p. 493-503, 2005.
- ASLANI, M.M.; ALIKHANI, M.Y.; ZAVARI, A.; YOUSEFI, R.; ZAMANI, A.R. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 2, p. 136-139, 2011.
- BAILEY, J. K.; PINYON, J. L.; ANANTHAM, S.; HALL, R. M. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 1331–1339, 2010.

- BAQUI, A. H.; SACK, R. B.; BLACK, R. E.; HAIDER, K.; HOSSAIN, A.; ALIM, A. R.; YUNUS, M.; CHOWDHURY, H. R.; SIDDIQUE, A. K. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. **J. Infect. Dis.**, v. 166, p. 792–796, 1992.
- BEAUCHEMIN, N.; DRABER, P.; DVEKSLER, G.; GOLD, P.; GRAY-OWEN, S.; GRUNERT, F.; HAMMARSTROM, S.; HOLMES, K. V.; KARLSSON, A.; KUROKI, M.; LIN, S. H.; LUCKA, L.; NAJJAR, S. M.; NEUMAIER, M.; OBRINK, B.; SHIVELY, J. E.; SKUBITZ, K. M.; STANNERS, C. P.; THOMAS, P.; THOMPSON, J. A.; VIRJI, M.; VON KLEIST, S.; WAGENER, C.; WATT, S.; ZIMMERMANN, W. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. **Exp. Cell Res.**, v. 252, p. 243–249, 1999.
- BEINKE, C.; LAARMANN, S.; WACHTER, C.; KARCH, H.; GREUNE, L.; SCHMIDT, M.A. Diffusely Adhering *Escherichia coli* strains induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of Esp proteins. **Infection And Immunity**, p. 528–539, 1998.
- BELOIN, C.; MICHAELIS, K.; LINDNER, K.; LANDINI, P.; HACKER, J.; GHIGO, J.; DOBRINDT, U. The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 4, p. 1316–1331, 2006.
- BENCHIMOL, S.; FUKS, A.; JOTHY, S.; BEAUCHEMIN, N.; SHIROTA, K.; STANNERS, C. P. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. **Cell**, 57, p. 327–334, 1989.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 57, n. 5, p. 1506–1511, 1989.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesion mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). **Infection and immunity**, v. 60, n. 1, p. 13–18, 1992a.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. **Mol. Microbiol.**, 6, p. 1539–1546, 1992b.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains—processing of AIDA-I. **Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.**, 278, p. 197–208, 1993.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Glycosylation with heptose residues mediated by the aah gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1403–1413, 2001.
- BERGER, C.N.; BILLKER, O.; MEYER, T.F.; SERVIN, A.L.; KANSAU, I. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). **Molecular Microbiology**, 52 (4), p. 963–983, 2004.
- BEMET-CAMARD, M. F.; COCONNIER, M. H.; HUDAULT, S.; SERVIN, A. L. Differential expression of complement proteins and regulatory decay accelerating

factor in relation to differentiation of cultured human colon adenocarcinoma cell lines. **Gut**, v. 38, p. 248-253, 1996.

BERNET-CAMARD, M. F.; COCONNIER, M. H.; HUDAULT, S.; SERVIN, A. L. Pathogenicity of the diffusely adhering Strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 64, n.6, p. 1918–1928, 1996.

BERSTAD, A. E.; BRANDTZAEG, P. Expression of cell membrane complement regulatory glycoproteins along the normal and diseased human gastrointestinal tract. **Gut**, v. 42, p. 522–529, 1998.

BETIS, F.; BREST, P.; HOFMAN, V.; GUIGNOT, J.; BERNET-CAMARD, M. F.; ROSSI, B.; SERVIN, A.; HOFMAN, P. The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1068–1074, 2003.

BETIS, F.; BREST, P.; HOFMAN, V.; GUIGNOT, J.; KANSAU, I.; ROSSI, B.; SERVIN, A.; HOFMAN, P. Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* infection in T84 cell monolayers induces increased neutrophil transepithelial migration, which in turn promotes cytokine dependent upregulation of decay-accelerating factor (CD55), the receptor for Afa/Dr adhesins. **Infection and Immunity**, p. 1774–1783, 2003.

BEUTIN, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. **Med. Microbiol. Immunol.**, 180, p. 167-182, 1991.

BISHOP, A. L.; HALL, A. Rho GTPases and their effector proteins. **Biochem. J.**, v. 348, p. 241-255, 2000.

BILGE, S. S.; CLAUSEN, C. R.; LAU, W.; MOSELEY, S. L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 Cells. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 8, p. 4281-4289, 1989.

BILGE, S. S.; APOSTOL, Jr. J. M.; FULLNER, K. J.; MOSELEY, S. L.; Transcriptional organisation of the F1845 fimbrial adhesion determinant of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol**, 7 (6), p. 993-1006, 1993.

BLANC-POTARD, A. B.; TINSLEY, C.; SCALETSKY, I.; LE BOUGUENEC, C.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A. L.; NASSIF, X.; CAMARD, M. F. B. Representational difference analysis between Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* and nonpathogenic *E. coli* K-12. **Infection and immunity**, v. 70, n.10, p. 5503–5511, 2002.

BLANCO, J.; GONZALEZ, E. A.; ESPINOSA, P.; BLANCO, M.; GARABAL, J. I.; ALONSO, M. P. Enterotoxigenic and necrotizing *Escherichia coli* in human diarrhea in Spain. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 8, n. 4, p. 548-552, 1992.

BLOCH, C. A.; STOCKER, B. A.; ORNDORFF, P. E. A key role for type 1 pili in enterobacterial communicability. **Mol. Microbiol.**, v. 6, n. 6, p. 697-701, 1992.

BOSCHI-PINTO, C.; VELEBIT, L.; SHIBUYA, K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *World Health Organ.*, v. 86, p. 710–717, 2008.

BRAUN, V.; FOCARETA, T. Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). **Critical Reviews in Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 115-158, 1991.

BREST, P.; BETIS, F.; ÇUBURU, N.; SELVA, E.; HERRANT, M.; SERVIN, A.; AUBERGER, P.; HOFMAN, P. Increased rate of apoptosis and diminished phagocytic ability of human neutrophils infected with Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strains. **Infection and immunity**, v. 72, n. 10, p. 5741–5749, 2004.

BREST, P.; BETIS, F.; CUBURU, N.; SELVA, E.; HERRANT, M.; SERVIN, A.; AUBERGER, P.; HOFMAN, P. Increased rate of apoptosis and diminished phagocytic ability of human neutrophils infected with Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.**, V. 72, P. 5741-9, 2004.

CALVA, J. J.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; CERON, C. Antimicrobial resistance in fecal flora: longitudinal community-based surveillance of children from urban Mexico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, n. 7, p. 1699–1702, 1996.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-552, 2004.

CANE, G.; MOAL, V. L.; PAGE, G.; SERVIN, A. L.; HOFMAN, P.; VOURET-CRAVIARI, V. Up-regulation of intestinal vascular endothelial growth factor by Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 12, e1359, 2007.

CANE, G.; GINOUVÈS, A.; MARCHETTI, S.; BUSCÀ, R.; POUYSSÉGUR, J.; BERRA, E.; HOFMAN, P.; VOURET-CRAVIARI, V.; HIF-1a mediates the induction of IL-8 and VEGF expression on infection with Afa/Dr diffusely adhering *E. coli* and promotes EMT-like behaviour. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 640–653, 2010.

CHARBONNEAU, M. E.; BERTHIAUME, F.; MOUREZ, M. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8504–8512, 2006.

CHARBONNEAU, M. E.; MOUREZ, M. The *Escherichia coli* AIDA-I autotransporter undergoes cytoplasmic glycosylation independently of export. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 537-544, 2008.

CHARBONNEAU, M. E.; BERTHIAUME, F.; MOUREZ, M. Autoprocessing of the *Escherichia coli* AIDA-I autotransporter: a new mechanism involving acidic residues in the junction region. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 25, p. 17340–17351, 2009.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71–87, 2012.

COLONNA, B.; RANUCCI, L.; FRADIANI, P. A.; CASALINO, M.; CALCONI, A.; NICOLETI, M. Organization of aerobactin, hemolysin, and antibacterial resistance

- genes in lactose-negative *Escherichia coli* strains of serotype O4 isolated from children with diarrhea. **Infecton and Immunity**, v. 60, n. 12, p. 5224-5231, 1992.
- CONNELL, H.; AGACE, W.; KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; MARILD, S.; SVANBORG, C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract (urinary tract infection/inflammation/adherence/neutrophil influx). **Medical Sciences**, v. 93, p. 9827-9832, 1996.
- COOKSON, S. T.; NATARO, J. P. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 21, p. 421–434, 1996.
- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science.**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.
- COTA, E.; JONES, C.; SIMPSON, P.; ALTROFF, H.; ANDERSON, K. L.; DU MERLE, L.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A.; LE BOUGUÉNEC, C.; MARDON, H.; MATTHEWS, S. The solution structure of the invasive tip complex from Afa/Dr fibrils. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 356–366, 2006.
- CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFAN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **Lancet**, v. 337, p. 262–264, 1991.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews**, v. 8, 2010.
- CZECZULIN, J. R.; HICKS, S. B. S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 65, p. 4135–4145, 1997.
- CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 6, n. 6, p. 2692–2699, 1999.
- COOKSON, S.T.; NATARO, J.P. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, 21, p. 421–434, 1996.
- DAIGLE, F.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J. M.; LEBEL, P. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. **Can. J. Microbiol.**, v. 40, p. 286–291, 1994.
- DHAKAL, B. K.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 38, n. 2, p. 2-11, 2008.
- DANESE, P. N.; PRATT, L. A.; DOVE, S. L.; KOLTER, R. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 424-432, 2000.

- DAS, M.; TASSELL, A. H. V.; URVIL, P. T.; LEA, S.; PETTIGREW, D.; ANDERSON, K. L.; SAMET, A.; KUR, J.; MATTHEWS, S.; NOWICKI, S.; POPOV, V.; GOLUSZKO, P.; NOWICKI, B. J. Hydrophilic domain II of *Escherichia coli* Dr fimbriae facilitates cell invasion. **Infection and immunity**, v. 73, n.9, p. 6119–6126, 2005.
- DAWSON, K. G.; EMERSON, J. C.; BURNS, J. L. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 18, p. 816–822, 1999.
- DE LORENZO, V.; 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.
- DHAKAL, B. K.; MULVEY, M. A. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. **Cell. Host. Microbe.**, v. 19, n. 11, p. 58-69, 2012.
- D'ORAZIO, S. E.; COLLINS, C. M. Molecular pathogenesis of urinary tract infections. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 225, p. 137–164, 1998.
- ECHEVERRIA, P.; TAYLOR, D. N.; BETTELHEIM, K. A.; CHATKAEOMORAKOT, A.; CHANGCHAWALIT, S.; THONGCHAROEN, A.; LEKSOMBOON, U. HeLa cell-adherent enteropathogenic *Escherichia coli* in children under 1 year of age in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 1472-1475, 1987.
- ECHEVERRIA, P.; SERICHANTALERG, O.; CHANGCHAWALIT, S.; BAUDRY, B.; LEVINE, M. M.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infantile diarrhea. **J. Infect. Dis.**, 165, p. 141–143, 1992.
- ELLIOTT, S. J.; SRINIVAS, S.; ALBERT, M. J.; ALAM, K.; ROBINS-BROWNE, R. M.; GUNZBURG, S. T.; MEE, B. J.; CHANG, B. J. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2040–2051, 1998.
- ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 3155–3163, 1998.
- ESTRADA-GARCÍA, T.; CERNA, J. F.; PAHECO-GIL, L.; VELÁZQUEZ, R. F.; OCHOA, T. J.; TORRES, J.; DUPONT, H. L. Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p.1306-1308, 2005.
- FASANO, A.; NATARO, J. P. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. **Adv. Drug Deliv.**, v. 56, p. 795–807, 2004.
- FORESTIER, C.; MEYER, M.; FAVRE-BONTE, S.; RICH, C.; MALPUECH, G.; LE BOUGUENEC, C.; SIROT, J.; JOLY, B.; DE CHAMPS, C. Enteroadherent *Escherichia coli* and diarrhea in children: a prospective case-control study. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2897–2903, 1996.
- FOXMAN, B.; ZHANG, L.; PALIN, K.; TALLMAN, P.; MARRS, C. F. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. **J. Infect. Dis.**, 171, p. 1514–1521, 1995.

- FREITAG, C. S.; ABRAHAM, J. M.; CLEMENTS, J. R.; EISENSTEINI, B. I. Genetic analysis of the phase variation control of expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 162, n. 2, p. 668-675, 1985.
- FUJITA, T.; INOUE, T.; OGAWA, K.; IIDA, K.; TAMURA, N. The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb. **J. Exp. MED.**, v. 166, p. 1221-1228, 1987.
- GADEBERG, O. V.; QRSKOV, I.; RHODES, J. M. Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes in vitro. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 358-364, 1983.
- GAILLARD, J. L.; CHERON, G.; MOUGENOT, J. F.; DESLYS, J. P.; NEZELOF, C.; VERON, M.; SCHIMITZ, J. Pyelonephritic *Escherichia coli* strains as intestinal pathogens in two newborn infants. **Lancet.**, v. 11, n. 1, p. 327-328, 1989.
- GARCIA, M. I.; LABIGNE, A.; LE BOUGUENEC, C. Nucleotide sequence of the afimbrial-adhesin-encoding *afa-3* gene cluster and its translocation via flanking IS1 insertion sequences unite des entgrobacteries. **Journal of bacteriology**, p. 7601-7613, 1994.
- GARCIA, M. I.; GOUNON, P.; COURCOUX, P.; LABIGNE, A.; LE BOUGUENEC, C. The afimbrial adhesive sheath encoded by the *afa-3* gene cluster of pathogenic *Escherichia coli* is composed of two adhesins. **Mol. Microbiol.**, 19, p. 683-693, 1996.
- GARCIA, M.I.; ; JOUVEA, M.; NATAROC, J.P.; GOUNONB, P.; LE BOUGUE"NECA, C. Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extra-intestinal infections. **FEBS Letters**, 479, p. 111-117, 2000.
- GARCIA, C.; CHINCHA, O.; LEON, M.; IGLESIAS, D.; BARLETTA, F.; MERCADO, E.; OCHOA, T. Short report: high frequency of diarrheagenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus (HIV) patients with and without diarrhea in Lima, Perú. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, n. 6, p. 1118-1120, 2010.
- GERARDIN, J.; LALIOUI, L.; JACQUEMIN, E.; LE BOUGUENEC, C.; MAINIL, J. G. The *afa*-related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the *afa-8* variant. **Vet. Microbiol.**, 76, p. 175-184, 2000.
- GERMANI, Y.; BEGAUD, E.; DUVAL, P.; LE BOUGUENEC, C. Prevalence of Enteropathogenic, Enteraggregative., and Diffusely Adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in New Caledonia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, p. 1124-1126, 1996.
- GERMANI, Y.; BEGAUD, E.; DUVAL, P.; LE BOUGUENEC, C. An *Escherichia coli* clone carrying the adhesin-encoding *afa* operon is involved in both diarrhoea and cystitis in twins. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, 1997.
- GIRARD, V.; CÔTÉ, J. P.; CHARBONNEAU, M. E.; CAMPOS, M.; BERTHIAUME, F.; HANCOCK, M. A.; SIDDIQUI, N.; MOUREZ, M. Conformation change in a self-recognizing autotransporter modulates bacterial cell-cell interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 14, p. 10616-10626, 2010.

- GIRARDEAU, J. P.; LALIOUI, L.; SAID, A. M.; DE CHAMPS, C.; LE BOUGUENEC. Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8* operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 1, p. 218–226, 2003.
- GIRON, J. A.; JONES, T.; MILLAN-VELASCO, F.; CASTRO-MUNOZ, E.; ZARATE, L.; FRY, J.; FRANKEL, G.; MOSELEY, S. L.; BAUDRY, B.; KAPER, J. B. Diffuse adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 507–513, 1991.
- GIUGLIANO, L. G.; MEYER, C. J.; ARANTES, L. C.; RIBEIRO, S. T.; GIUGLIANO, R. Mannose-resistant haemagglutination (MRHA) and haemolysin (Hly) production of strains of *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea: effect of breastfeeding. **J Trop Pediatr.**, v. 39, n. 3, p. 183-187, 1993.
- GLAS, J.; MARTIN, K.; BRUNNLER, G.; KOPP, R.; FOLWACZNY, C.; WEISS, E. H.; ALBERT, E. D. MICA, MICB and C1_4_1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Tissue Antigens**, v. 58, p. 243–249, 2001.
- GOLUSZKO, P.; SELVARANGAN, R.; POPOV, V.; PHAM, T.; WEN, J. W.; SINGHAL, J. Decay-accelerating factor and cytoskeleton redistribution pattern in HeLa cells infected with recombinant *Escherichia coli* strains expressing Dr family of adhesions. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 3989–3997, 1999.
- GOLUSZKO, P.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, B. J.; NOWICKI, S.; HART, A.; PAWELCZYK, E.; NGUYEN, K. Rapid receptor-clustering assay to detect uropathogenic and diarrheal *Escherichia coli* isolates bearing adhesins of the Dr family. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.6, p. 2317–2320, 2001.
- GOMES, T. A. T.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 266-269, 1989.
- GOMES, T. A. T.; ABE, C. M.; MARQUES, L. R. M. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3364, 1995.
- GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ABE, C. M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P. M.; RAMOS, S. R. T. S. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3609–3613, 1998.
- GOMEZ-DUARTE, O. G.; ARZUZA, O.; URBINA, D.; BAI, J.; GUERRA, J.; MONTES, O.; PUELLO, M.; MENDOZA, K.; CASTRO, G. Y. Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean–Colombian cities. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 2, p. 199-206, 2010.
- GOUNON, P.; JOUVE, M.; LE BOUGUENEC, C. Immunocytochemistry of the AfaE adhesin and AfaD invasins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains during

- interaction of the bacteria with HeLa cells by high-resolution scanning electron microscopy. **Microbes Infect.**, 2, p. 359–365, 2000.
- GRIMM, M. C.; ELSBURY, S. K. O.; PAVLI, P.; DOE, W. F. Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 38, p. 90–98, 1996.
- GRUNERT, F.; DANIEL, S.; NAGEL, G.; VON KLEIST, S.; JANTSCHKEFF, P. CD66b, CD66c and carcinoembryonic antigen (CEA) are independently regulated markers in sera of tumor patients. **Int. J. Cancer**, v. 63, p. 349–355, 1995.
- GUIGNOT, J.; PEIFFER, I.; BERNET-CAMARD, M. F.; LUBLIN, D. M.; CARNOY, C.; MOSELEY, S. L.; SERVIN, A. L. Recruitment of CD55 and CD66e brush border-associated glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli* that infect the human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3554–3563, 2000.
- GUIGNOT, J.; BREARD, J.; BERNET-CAMARD, M. F.; PEIFFER, I.; NOWICKI, B. J.; SERVIN, A. L.; BLANC-POTARD, A. B. 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.
- GUIGNOT, J.; BERNET-CAMARD, M. F.; POU, C.; PLANÇON, L.; LE BOUGUENEC, C.; SERVIN, A. L. Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain ih11128 into human epithelial cells: evidence for $\alpha 5\beta 1$ integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. **Infection and immunity**, v. 69, n.3, p. 1856–1868, 2001.
- GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 204–221, 2007.
- GUIGNOT, J.; HUDAULT, S.; KANSAU, I.; CHAU, I.; SERVIN, A. L. Human Decay-accelerating factor and CEACAM receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* in epithelial cells. **Infection and immunity**, v.77, n.1, p. 517–531, 2009.
- GUIGNOT, J.; HUDAULT, S.; KANSAU, I.; CHAU, I.; SERVIN, A.L. Human decay-accelerating factor and CEACAM receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa. **Infection and Immunity**, p. 517–531, 2009.
- GUION, C.E.; OCHOA, T.J.; WALKER, C.M.; BARLETTA, F.; CLEARY, T.G. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1752–1757, 2008.
- GUNZBURG, S. T.; CHANG, B. J.; ELLIOTT, S. J.; BURKE, V.; GRACEY, M. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 755–758, 1993.
- GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Identification of *sat*, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**; v. 38, n. 1, p. 53–66, 2000.

- HACKER, J.; KESTLER, H.; HOSCHÜTZKY, H.; JANN, K.; LOTTSPEICH, F.; KORHONEN, T.K. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 2, p. 544-550, 1993.
- HASMAN, H.; CHAKRABORTY, T.; KLEMM, P. Antigen 43 mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4834-4841, 1999.
- HENDERSON, I. R.; MEEHAN, M.; OWEN, P. Antigen 43, a phase variable outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12. **FEMES Microbiology Letters**, v. 149, p. 115-120, 1997.
- HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1231-1243, 2001.
- HERZER, P. J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAM, T. S.; Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-Stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 11, p. 6175-6181, 1990.
- HOFMAN, P.; PICHE, M.; FAR, D. F.; LE NEGRATE, G.; SELVA, E.; LANDRAUD, L.; ALLIANA-SCHMID, A.; BOQUET, P.; ROSSI, B. Increased *Escherichia coli* phagocytosis in neutrophils that have transmigrated across a cultured intestinal epithelium. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 449-455, 2000.
- HOLDEN, N.; COTTERILL, C.; GALLY, D. Examination of regulatory cross-talk between the decay accelerating factor-binding fimbrial/afimbrial adhesins and type I fimbriae. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 485, p. 143-150, 2000.
- HUANG, D.B.; NATARO, J.P.; DUPONT, H.L.; KAMAT, P.P.; MHATRE, A.D.; OKHUUSEN, P.C.; CHIANG, T. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 5, p. 556-563, 2006.
- HUANG, D. B.; MOHAMED, J. A.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; OKHUUSEN, P. C. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travelers to developing countries. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, n. 10, p. 1386-1392, 2007.
- INABA, T.; MIZUNO, M.; OHYA, S.; KAWADA, M.; UESU, T.; NASU, J.; TAKEUCHI, K.; NAKAGAWA, M.; OKADA, H.; FUJITA, T.; TSUJI, T. Decay-accelerating factor (DAF) in stool specimens as a marker of disease activity in patients with ulcerative colitis (UC). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 112, p. 237-241, 1998.
- JALLAT, C.; LIVRELLI, V.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; RICH, C.; JOLY, B. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. **Journal of clinical microbiology**, v.31, n.8, p. 2031-2037, 1993.
- JALLAT, C.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; RICH, C.; JOLY, B. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. **Res. Microbiol.**, v. 145, p. 621-632, 1994.

- JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. rev.** 4, p. 80–128, 1991.
- JOHNSON, J. R.; SKUBITZ, K. M.; NOWICKI, B. J.; JACQUES-PALAZ, K.; RAKITA, R. M. Nonlethal adherence to human neutrophils mediated by Dr antigen-specific adhesins of *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 63, n. 1, p. 309–316, 1995.
- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 261–272, 2000.
- JONES, C. H.; PINKNER, J. S.; ROTH, R.; HEUSER, J.; NICHOLAS, V.; ABRAHAM, S. N.; HULTGREN, S. J. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. **Biochemistry**, v. 92, p. 2081-2085, 1995.
- JOUVE, M.; GARCIA, M.; COURCOUX, P.; LABIGNE, A.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the *afa-3* gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. **Infection and Immunity**, v.65, n.10, p. 4082-4089, 1997.
- KAHALI, S.; SARKAR, B.; RAJENDRAN, K.; KHANAM, J.; YAMASAKI, S.; NANDY, R.K.; BHATTACHARYA, S.K.; RAMAMURTHY, T. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 9, p. 4111-4120, 2004.
- KANG, G.; MATHAN, M. M.; MATHAN, V. I. Evaluation of a simplified HEp-2 cell adherence assay for *Escherichia coli* isolated from south Indian children with acute diarrhea and controls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 2204–2205, 1995.
- KANSAU, I.; BERGER, C.; HOSPITAL, M.; AMSELLEM, R.; NICOLAS, V.; SERVIN, A. L.; BERNET-CAMARD, M. F. Zipper-like internalization of Dr-positive *Escherichia coli* by epithelial cells is preceded by an adhesin-induced mobilization of raft-associated molecules in the initial step of adhesion. **Infection and immunity**, v. 72, n.7, p. 3733–3742, 2004.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Patogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.
- KARAN, M. R. A; OLOOMI, M.; HABIBI, M.; BOUZARI, S. Cloning of fimH and fliC and expression of the fusion protein FimH/FliC from uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated in Iran. **Iran J. Microbiol.**, v. 4, n. 2, p. 55-62, 2012.
- KERNEIS, S.; BILGE, S. S.; FOUREL, V.; CHAUVIERE, G.; COCONNIER, I. M. H.; SERVINI, A. L. Use of purified F1845 fimbrial adhesin to study localization and expression of receptors for diffusely adhering *Escherichia coli* during enterocytic differentiation of human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2 in culture. **Infection and immunity**, v. 59, n.11, p. 4013-4018, 1991.
- KISIELA, D. I.; CHATTOPADHYAY, S.; TCHESNOKOVA, V.; PAUL, S.; WEISSMAN, S. J.; MEDENICA, I.; CLEGG, S.; SOKURENKOVA, E. V. Evolutionary analysis points to divergent physiological roles of type 1 fimbriae in *Salmonella* and *Escherichia coli*. **MBio.**, v. 4, n. 2, 2013.

- KLEMM, P.; JORGENSEN, B. J.; VAN DIE, I.; DE REE, H.; BERGMANS, H. The *fim* genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. **Mol. Gen. Genet.**, v. 199, n. 3, p. 410-414, 1985.
- KLEMM, P.; HJERRILD, L.; GJERMENSEN, M.; SCHEMBRI, M. A. Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 283–296, 2004.
- KLEMM, P.; VEJBORG, R. M.; SHERLOCK, O. Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 296, n. 4-5, p. 187-95, 2006.
- KYAW, C. M.; DE ARAUJO, C. R.; LIMA, M. R.; GONDIM, E. G. S.; BRÍGIDO, M. M.; GIUGLIANO, L. G. Evidence for the presence of a type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC). **Infection, Genetics and Evolution.**, v. 3, p. 111-117, 2002.
- KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 6, p. 1995-1998, 1990.
- KUKKONEN, M.; RAUNIO, T.; VIRKOLA, R.; LAHTEENMAKI, K.; MAKELA, P.H.; KLEMM, P.; CLEGG, S. S.; KORHONEN, T. K. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. **Mol. Microbiol.**, v. 7, n. 2, p. 229–237, 1993.
- LAARMANN, S.; SCHMIDT, M. A. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesion recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. **Microbiology**, v. 149, p. 1871–1882, 2003.
- LABIGNE-ROUSSEL, A. F.; LARK, D.; SCHOOLNIK, G.; FALKOW, S. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. **Infection and immunity**, p. 251-259, 1984.
- LABIGNE-ROUSSEL, A.; SCHMIDT, M. A.; WALZ, W.; FALKOW, S. Genetic organization of the afimbrial adhesin operon and nucleotide sequence from a uropathogenic *Escherichia coli* gene encoding an afimbrial adhesion. **Journal of bacteriology**, v. 162, n. 3, p. 1285-1292, 1985.
- LABIGNE-ROUSSELI, A; FALKOW, S. Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial-adhesin-encoding operon (*afa*) among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 3, p. 640-648, 1988.
- LALIOUI, L.; JOUVE, M.; GOUNON, P.; LE BOUGUENEC, C. Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. **Infection and immunity**, v.67, n. 10, p. 5048–5059, 1999.
- LALIOUI, L.; LE BOUGUENEC, C. *afa-8* gene cluster is carried by a pathogenicity island inserted into the tRNA^{phe} of human and bovine pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Infection and immunity**, v. 69, n. 2, p. 937–948, 2001.
- LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 181–189, 2004.

- LANGERMANN, S.; BALLOU, W. R. Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *Escherichia coli* urinary tract infections. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 84-86, 2001.
- 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**, p. 1189-1193, 1992.
- LE BOUGUENEC, C.; GARCIA, M. I.; OUIN, V.; DESPERRIER, J. M.; GOUNON, P.; LABIGNE, A. Characterization of plasmid-borne *afa-3* gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. **Infection and immunity**, v. 61, n. 12, p. 5106-5114, 1993.
- LE BOUGUENEC, C.; LALIOUI, L.; MERLE, L.; JOUVE, M.; COURCOUX, P.; BOUZARI, S.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, B.J.; GERMANI, Y.; ANDREMONT, A.; GOUNON, P.; GARCIA, M.I. Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. **Journal Of Clinical Microbiology**, p. 1738–1745, 2001.
- LE BOUGUENEC, C.; SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 256, p. 185–194, 2006.
- LEVINE, M. M.; PRADO, V.; ROBINS-BROWNE, R.; LIOR, H.; KAPER, J. B.; MOSELEY, S. L.; GICQUELAIS, K.; NATARO, J. P.; VIAL, P.; TALL, B. Use of DNA probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 158, n. 1, p. 224-228, 1988.
- LEVINE, M. M.; FERRECCIO, C.; PRADO, V.; CAYAZZO, M.; ABREGO, P.; MARTINEZ, J.; MAGGI, L.; BALDINI, M. M.; MARTIN, W.; MANEVAL, D. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago. **Chile. Am. J. Epidemiol.**, v. 138, p. 849–869, 1993.
- LOPES, L.M.; FABBRICOTTI, S.H.; FERREIRA, A.J.P.; KATO, M.A.M.F.; MICHALSKI, J.; SCALETSKY, I.C.A. Heterogeneity among Strains of Diffusely Adherent *Escherichia coli* Isolated in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1968–1972, 2005.
- LOUVARD, D.; KEDINGER, M.; HAURI, H. P. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, v. 8, p. 157–195, 1992.
- LOZER, D. M.; SOUZA, T. B.; MONFARDINI, M. V.; VICENTINI, F.; KITAGAWA, S. M. S.; SCALETSKY, I. C. A.; SPANO, L. C. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in rural communities. **BMC Inf. Dis.**, 2013, submetido.
- LUBLIN, D. M.; ATKINSON, J. P. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 35–58, 1989.
- LUBLIN, D. M.; KOMPELLI, S.; STORRY, J. R.; REID, M. E. Molecular basis of Cromer blood group antigens. **Transfusion**, v. 40, p. 208–213, 2000.

- LUND, B.; MARKLUND, B.I.; STRÖMBERG, N.; LINDBERG, F.; KARLSSON, K.A.; NORMARK, S. Uropathogenic *Escherichia coli* can express serologically identical pili of different receptor binding specificities. **Mol. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 255-263, 1988.
- MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.
- MAINIL, J. G.; JACQUEMIN, E.; HERAULT, F.; OSWALD, E. Presence of pap-, sfa-, and afa-Related Sequences in Necrotoxicogenic *Escherichia coli* Isolates from Cattle: Evidence for New Variants of the AFA Family. **Can J Vet Res.**, v. 61, p. 193-199, 1997.
- MANDLIK, A.; SWIERCZYNSKI, A.; DAS, A.; TON-THAT, H. Pili in gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. **TRENDS in Microbiology**, v.16, n. 1, p. 33-40, 2007.
- MANSAN-ALMEIDA, R.; PEREIRA, A. L.; GIUGLIANO, L. G. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 22, p. 1471-2180, 2013.
- MARIN-ESTEBAN, V.; TURBICA, I.; DUFOUR, G.; SEMIRAMOTH, N.; GLEIZES, A.; GORGES, R.; BEAU, I.; SERVIN, A. L.; MOAL, V. L.; SANDRÉ, C.; CHOLLET-MARTINA, S. Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain c1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 5, p. 1891–1899, 2012.
- MARQUES, L.R.M.; ABE, C.M.; GRIFFIN, P.M.; GOMES, T.A.T. Association between alpha-hemolysin production and HeLa cell-detaching activity in fecal isolates of *Escherichia coli*. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2707–2709, 1995.
- MARTINEZ, J. J.; MULVEY, M. A.; SCHILLING, D. J.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO J.**, v. 19, n.12, p. 2803–2812, 2000.
- MATHEWSON, J. J.; OBERHELMAN, R. A.; DUPONT, H. L.; DE LA CABADA, J.; GARIBAY, E. V. Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 1917-1919, 1987.
- MAURER, J.; JOSE, J.; MEYER, T. F. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 22, p. 7014–7020, 1999.
- McDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.; A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl Acad. Sci.USA** 92, p. 1664–1668, 1995.

- MEDOF, M. E.; WALTER, E. I.; RUTGERS, J. L.; KNOWLES, D. M.; NUSSENZWEIG, V.; Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. **J. Exp. MED.**, v. 165, p. 848-864, 1987.
- MENDEZ-ARANCIBIA, E.; VARGAS, M.; SOTO, S.; RUIZ, J.; KAHIGWA, E.; SCHELLENBERG, D.; URASSA, H.; GASCÓN, J.; VILA, J. Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 985–989, 2008.
- MERAZ, I.M.; ARIKAWA, K.; NAKAMURA, H.; OGASAWARA, J.; HASE, A.; NISHIKAWA, Y. Association of IL-8-Inducing Strains of Diffusely Adherent *Escherichia coli* with Sporadic Diarrheal Patients with Less Than 5 Years of Age. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 11(1), p. 44-49, 2007.
- MERAZ, I.M.; JIANG, Z.D.; ERICSSON, C.D.; BOURGEOIS, L.; STEFFEN, R.; TAYLOR, D.N.; HERNANDEZ, N.; DUPONT, H.L. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Diffusely Adherent *E. coli* as Likely Causes of a Proportion of Pathogen-Negative Travelers Diarrhea — A PCR-Based Study. **Journal of Travel Medicine**, v. 15, n.6, p. 412–418, 2008.
- MITSUMORI, K.; TERAJ, A.; YAMAMOTO, S.; YOSHIDA, O. Virulence characteristics and DNA fingerprints of *Escherichia coli* isolated from women with acute uncomplicated pyelonephritis. **J. Urol.**, v. 158, p. 2329–2332, 1997.
- MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L.; NATARO, J. P. BELKIND-GERSON, J.; OKHUYSEN, P. C. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 121–126, 2007.
- MOON, J.Y.; PARK, J.H.; KIM, Y.B. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, n. 2, p. 215-220, 2005.
- MORENO, A.C.; FILHO, A.F.; GOMES, T.A.; RAMOS, S.T.; MONTEMOR, L.P.; TAVARES, V.C.; FILHO, L.S.; IRINO, K.; MARTINEZ, M.B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, n. 1, p.50-57, 2010.
- MULVEY, M. A.; LOPEZ-BOADO, Y. S.; WILSON, C. L.; ROTH, R.; PARKS, W. C.; HEUSER, J.; HULTGREN, S. J. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. **Science** v. 282, p. 1494–1497, 1998.
- NATARO, J. P.; SCALETSKY, I. C.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; TRABULSI, L. R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 48, p. 378–383, 1985.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 829–831, 1987.

- NATARO, J.P.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.D.; VIAL, P.A.; SEARS, C.L. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 11, p. 4761-4768, 1996.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11, p. 142–201, 1998.
- NICHOLSON-WELLER, A.; WANG, C. E. Structure and function of decay-accelerating factor CD55. **J. Lab Clin. Med.**, v. 123, p. 485–491, 1994.
- NOWICKI, B.; BARRISH, J. P.; KORHONEN, T.; HULL, R. A.; HULL, S. I. Molecular cloning of the *Escherichia coli* 075X adhesin. **Infect. Immun.**, v. 55, n.12, p. 3168-3173, 1987.
- NOWICKI, B.; MOULDS, J.; HULL, R.; HULLA, S. A Hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli* recognizes the Dr Blood Group Antigen. **Infection and immunity**, v.56, n. 5, p. 1057-1060, 1988.
- NOWICKI, B.; TRUONG, L.; MOULDS, J.; HULL, R. Presence of the Dr receptor in normal human tissues and its possible role in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **American Journal of Pathology**, v. 133, n. 1, 1988.
- NOWICKI, B.; SVANBORG-EDEN, C.; HULL, R.; HULL, S. Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 57, p. 446–451, 1989.
- NOWICKI, B.; LABIGNE, A.; MOSELEY, S.; HULL, R.; HULL, S.; MOULDS, J. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infection and immunity**, v. 58, n. 1, p. 279-281, 1990.
- NOWICKI, B.; HART, A.; COYNE, K. E.; LUBLIN, D. M.; NOWICKI, S. Short consensus repeat-3 domain of recombinant decay-accelerating factor is recognized by *Escherichia coli* recombinant Dr adhesin in a model of a Cell-Cell Interaction. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 2115-2121, 1993.
- NOWICKI, B.; SELVARANGAN, A. R.; NOWICKI, S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. **The Journal of Infectious Diseases**. v.183, n. 1, p. 24–27, 2001.
- NORIEGA, F. R.; LIAO, F. M.; FORMAL, S. B.; FASANO, A.; LEVINE, M. M. Prevalence of *Shigella* enterotoxin 1 among *Shigella* clinical isolates of diverse serotypes. **J. Infect. Dis.** 172, p. 1408–1410, 1995.
- OCHOA, T. J.; ECKER, L.; BARLETTA, F.; MISPIRETA, M. L.; GIL, A. I.; CONTRERAS, C.; MOLINA, M.; AMEMIYA, I.; VERASTEGUI, H.; HALL, E. R.; CLEARY, T. G.; LANATA, C. F.; Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from periurban areas in Lima, Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1694–702, 2009.
- OCHOA, T. J.; RUIZ, J.; MOLINA, M.; DEL VALLE, L. J.; VARGAS, M.; GIL, A. I.; ECKER, L.; BARLETTA, F.; HALL, E. R.; CLEARY, T. G.; LANATA, C. F. High frequency of antimicrobial resistance of diarrheagenic *E. coli* in peruvian infants. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 2, p. 296–301, 2009.

- OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A.; STEINRU, H.; KAPER, J. B. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 1, p. 7–12, 2000.
- OKEKE, I. N.; STEINRUCK, H.; KANACK, K. J.; ELLIOTT, S. J.; SUNDSTROM, L.; KAPER, J. B.; LAMIKANRA, A. Antibiotic-resistant cell-detaching *Escherichia coli* strains from Nigerian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 301–305, 2002.
- ONG, C. Y.; ULETT, G. C.; MABBETT, A. N.; BEATSON, S. A.; WEBB, H. I.; MONAGHAN, W.; NIMMO, G. R.; LOOKE, D. F.; MCEWAN, A. G.; SCHEMBRI, M. A. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1054–1063, 2008.
- OPINTAN, J. A.; BISHAR, R. A.; NEWMAN, M. J.; OKEKE, I. N. Carriage of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by older children and adults in Accra, Ghana. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, n. 7, p. 504-506, 2010.
- O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L. K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p. 125–136, 2005.
- PEIFFER, I.; SERVIN, A. L.; BERNET-CAMARD, M. F. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. **Infection and immunity**, v. 66, n. 9, p. 4036–4042, 1998.
- PEIFFER, I; BLANC-POTARD, A; BERNET-CAMARD, M; GUIGNOT, J; BARBAT, A; SERVIN, A. L. Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* C1845 Infection Promotes Selective Injuries in the Junctional Domain of Polarized Human Intestinal Caco-2/TC7 Cells. **Infect. Immun.**, p. 3431–3442, 2000.
- PEIFFER, I.; GUIGNOT, J.; BARBAT, A.; CARNOY, C.; MOSELEY, S. L.; NOWICKI, B. J.; SERVIN, A. L.; BERNET-CAMARD, M. F. Structural and functional lesions in brush border of human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells infected by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 10, p. 5979–5990, 2000.
- PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S. N.; GIUGLIANO, L. G. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 74, p. 195:366–74, 2007.
- PHAM, T.; KAUL, A.; HART, A.; GOLUSZKO, P.; MOULDS, J.; NOWICKI, S.; LUBLIN, D. M.; NOWICKI, B. J. *dra*-Related X adhesins of gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* recognize SCR-3 and SCR-4 domains of recombinant decay-accelerating factor. **Infection and immunity**, v. 63, n.5, p. 1663–1668, 1995.
- PHAM, T. Q.; GOLUSZKO, P.; POPOV, V.; NOWICKI, S.; NOWICKI, B. J. Molecular cloning and characterization of Dr-II, a nonfimbrial adhesin-I-like adhesin isolated from gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* that binds to decay-accelerating factor. **Infection and immunity**, v. 65, n. 10, p. 4309–4318, 1997.

- PICARD, B.; GARCIA, J. S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, N.; ELION, J.; DENAMUR, E. The Link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v.67, n.2, p. 546–553, 1999.
- PLANÇON, L.; DU MERLE, L.; LE FRIEC, S.; GOUNON, P.; JOUVE, M.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A.; LE BOUGUÉNEC, C. Recognition of the cellular β 1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of *afa* -expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 681–693, 2003.
- POITRINEAU, P.; FORESTIER, C.; MEYER, M.; JALLAT, C.; RICH, C.; MALPUECH, G.; DE CHAMPS, C. Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. **Journal of clinical microbiology**, v.33, n.7, p. 1961–1962, 1995.
- PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–293, 1998.
- RAJENDRAN, P.; AJJAMPUR, S. S.; CHIDAMBARAM, D.; CHANDRABOSE, G.; THANGARAJ, B.; SARKAR, R.; SAMUEL, P.; RAJAN, D. P.; KANG, G. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. **Diagn. Microbiol. Infect.**, v. 68, n. 2, p. 117-122, 2010.
- RAO, R. K.; BAKER, R. D.; BAKER, S. S.; GUPTA, A.; HOLYCROSS, M. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 273, p. G812-G823, 1997.
- REGUA-MANGIA, A.H.; GOMES, T.A.; VIEIRA, M.A.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L.M. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 414-422, 2009.
- REISNER, A.; HAAGENSEN, J. A. J.; SCHEMBRI, M. A.; ZECHNER, E. L.; MOLIN, S. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 933–946, 2003.
- ROCHE, A.; MCFADDEN, J.; OWEN, P. Antigen 43, the major phase-variable protein of the *Escherichia coli* outer membrane, can exist as a family of proteins encoded by multiple alleles. **Microbiology.**, v. 147, p. 161-169, 2001
- ROSA, A. C.; MARIANO, A. T.; PEREIRA, A. M.; TIBANA, A.; GOMES, T. A.; ANDRADE, J. R. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 781–790, 1998.
- ROWE, M. C.; WITHERS, H. L.; SWIFT, S. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. **FEMS Microbiol Lett**, v. 307, p. 102–109, 2010.
- SANSONETTI, P. Host–pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. **Gut** 50, Suppl. 3 S2–S8, 2002.

- SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTINS, B. M.; LEVINEO, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 90, p. 3093–3097, 1993.
- SCALETSKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, 45, p. 534–536, 1984.
- SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TOLEDO, M. R. F.; DAVIS, B. R.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Correlation between adherence to HeLa cells and serogroups, serotypes, and bioserotypes of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 3, p. 528–532, 1985.
- SCALETSKY, I. C. A.; PEDROSO, M. Z.; SILVA, R. M. Phenotypic and genetic features of *Escherichia coli* strains showing simultaneous expression of localized and diffuse adherence. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 23, p. 181–188, 1999.
- SCALETSKY, I. C.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, H. S.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, 40, p. 645–648, 2002a.
- SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTTI, S. H.; ARANDA, K. R.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1254–1258, 2002b.
- SCALETSKY, I. C. A.; FABBRICOTTI, S. H.; SILVA, S. O. C.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 8, p. 855–858, 2002c.
- SCALETSKY, I. C.; SOUZA, T. B.; ARANDA, K. R.; OKEKE, I. N. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. **Microbiology**, v. 10, n. 25, 2010.
- SCHEMBRI, M. A.; CHRISTIANSEN, G.; KLEMM, P. FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 1419–1430, 2001.
- SCHEMBRI, M. A.; KLEMM, P. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel FimH variants and ramifications for virulence. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1322–1328, 2001.
- SCHEMBRI, M. A.; HJERRILD, L.; GJERMANSEN, M.; KLEMM, P. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2236–2242, 2003.
- SCHEMBRI, M. A.; KJÆRGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 253–267, 2003.
- SCHOLZEL, S.; ZIMMERMANN, W.; SCHWARZKOPF, G.; GRUNERT, F.; ROGACZEWSKI, B.; THOMPSON, J. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and

oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 2, 2000.

SELVARANGAN, R.; GOLUSZKO, P.; POPOV, V.; SINGHAL, J.; PHAM, T.; LUBLIN, D. M.; NOWICKI, S.; NOWICKI, B. Role of decay-accelerating factor domains and anchorage in internalization of Dr-fimbriated *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 3, p. 1391–1399, 2000.

SELVARANGAN, R.; GOLUSZKO, P.; SINGHAL, J.; CARNOY, C.; MOSELEY, S.; HUDSON, B.; NOWICKI, S.; NOWICKI, B. Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in *Escherichia coli* renal persistence. **Infection and immunity**, v. 72, n. 8, p. 4827–4835, 2004.

SEMIRAMOTH, N.; GLEIZES, A.; TURBICA, I.; SANDRE, C.; MARIN-ESTEBAN, V.; GORGES, R.; SERVIN, A.; CHOLLET-MARTIN, S. Afa/Dr-expressing, diffusely adhering *Escherichia coli* strain C1845 triggers F1845 fimbria-dependent phosphatidylserine externalization on neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through an apoptosis-independent mechanism. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 2974-2983, 2010.

SERVIN, A.L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 264–292, 2005.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL'AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 983-997, 2001.

SHERLOCK, O.; SCHEMBRI, M.A.; REISNER, A.; KLEMM, P. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. **Journal Of Bacteriology**, v.186, n.23, p. 8058–8065, 2004.

SHERLOCK, O.; DOBRINDT, U.; JENSEN, J. B.; VEJBORG, R. M.; KLEMM, P. Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 5, p. 1798–1807, 2006.

SHIBUYA, K.; ABE, T.; FUJITA, T. Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human monocytes. **J. Immunol.**, v. 149, p. 1758–1762, 1992.

SOBIESZCZANSKA, B. M.; OSEK, J.; GRYKO, R.; DOBROWOLSKA, M. Association between cell-bound haemolysin and cell-detaching activity of *Escherichia coli* isolated from children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 325–330, 2006.

SOKURENKO, E. V.; COURTNEY, H. S.; OHMAN, D. E.; KLEMM, P.; HASTY, D. L. FimH family of type 1 fimbrial adhesions, functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 3, p. 748–755, 1994.

SOKURENKO, E. V.; CHESNOKOVA, V.; DYKHUIZEN, D. E.; OFEK, I.; WU, X. R.; KROGFELT, K. A.; STRUVE, C.; SCHEMBRI, M. A.; HASTY, D. L. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesion. **Microbiology**, v. 95, p. 8922–8926, 1998.

- SOTO, G. E.; HULTGREN, S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1059–1071, 1999.
- SOTO, S. M.; SMITHSON, A.; MARTINEZ, J. A.; HORCAJADA, J. P.; MENSA, J.; VILA, J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. **The Journal of Urology**, v. 177, p. 365-368, 2007.
- SOUZA, T. B.; LOZER, D. M.; KITAGAWA, S. M.; SPANO, L. C.; SILVA, N. P.; SCALETSKY, I. C. Real-time multiplex PCR assay and melting curve analysis for identifying diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):1031-3.
- SPANO, L.C.; SADOVSKY, A.D.I.; SEGUI, P.N.; SAICK, K.W.; KITAGAWA, S.M.S.; PEREIRA, F.E.L.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 359–363, 2008.
- STAPLETON, A.; MOSELEY, S.; STAMM, W. E. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* isolates causing first-episode and recurrent cystitis in women. **J. Infect. Dis.**, 163, p. 773–779, 1991.
- STEINER, T.S.; LIMA, A.A.; NATARO, J.P.; GUERRANT, R.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 1, p. 88-96, 1998.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates, overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS.**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.
- SUHR, M.; BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Processing of the AIDA precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. **Mol. Microbiol.**, v. 22, p. 31–42, 1996.
- SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 7046–7050, 1998.
- SUZART, S.; GUTH, B.E.; PEDROSO, M.Z.; OKAFOR, U.M.; GOMES, T.A. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, n. 2, p. 163-168, 2001.
- TACKET, C. O.; MOSELEY, S. L.; KAY, B.; LOSONSKY, G.; LEVINE, M. M. Challenge studies in volunteers using *Escherichia coli* strains with diffuse adherence to HEp-2 cells. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 550–552, 1990.
- TADDEI, C. R.; MORENO, C. R.; FILHO A. F.; MONTEMOR, L. P. G.; MARTINEZ, M. B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p. 249-253, 2003.

- TARTOF, S. Y.; SOLBERG, O. D.; RILEY, L. W. Genotypic analyses of uropathogenic *Escherichia coli* based on fimH single nucleotide polymorphisms (SNPs). **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1363–1369, 2007.
- TIENG, V.; LE BOUGUENEC, C.; DU MERLE, L.; BERTHEAU, P.; DESREUMAUX, P.; JANIN, A.; CHARRON, D.; TOUBERT, A. Binding of *Escherichia coli* adhesion AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 2977–2982, 2002.
- THOMPSON, J. A.; GRUNERT, F.; ZIMMERMAN, W. Carcinoembryonic antigen family: molecular biology and clinical perspective. **J. Clin. Lab. Anal.**, 5, p. 344–366, 1991.
- TOKUDA, K.; NISHI, J.; IMUTA, N.; FUJIYAMA, R.; KAMENOSONO, A.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiol. Immunol.**, v. 54, n. 6, p. 320-329, 2010.
- TORRES, A. G.; PAYNE, S. M. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *E. coli* O157:H7. **Mol. Microbiol.**, v. 23, n. 4, p. 825-833, 1997.
- UESU, T.; MIZUNO, M.; INOUE, H.; TOMODA, J.; TSUJI, T. Enhanced expression of decay accelerating factor and CD59/homologous restriction factor 20 on the colonic epithelium of ulcerative colitis. **Lab. Investig.**, v. 72, p. 587–591, 1995.
- ULETT, G. C.; VALLE, J.; BELOIN, C.; SHERLOCK, O.; GHIGO, J. M.; SCHEMBRI, M. A. Functional analysis of antigen 43 in Uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 7, p. 3233–3244, 2007.
- VILA, J.; VARGAS, M.; CASALS, C.; URASSA, H.; MSHINDA, H.; SCHELLEMBERG, D.; GASCON, J. Antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under the age of 5 years from Ifakara, Tanzania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 3022–3024, 1999.
- WACHTER, C.; BEINKE, C.; MATTES, M.; SCHMIDT, M. A. Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, 31, 6, p. 1695–1707, 1999.
- WEISS-MUSZKAT, M.; SHAKH, D.; ZHOU, Y.; PINTO, R.; BELAUSOV, E.; CHAPMAN, M. R.; SELA, S. Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1545–1554, 2010.
- WELCH, R. A.; HULL, R.; FALKOW, S. Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 42, n. 1, p. 178-186, 1983.
- WESTERLUND, B.; KUUSELA, P.; RISTELI, J.; RISTELI, L.; VARTIO, T.; RAUVALA, H.; VIRKOLA, R.; KORHONEN, T. K. The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. **Mol. Microbiol.**, v. 3, p. 329–337, 1989.

WHO. **Diarrhoea**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/> Acessado em 2012.

ZAIDI, M. B.; ZAMORA, E.; DIAZ, P.; TOLLEFSON, L.; FEDORKA-CRAY, P. J.; HEADRICK, M. L. Risk factors for fecal quinolone-resistant *Escherichia coli* in Mexican children. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 1999–2001, 2003.

VAISANEN-RHEN, V. Fimbria-Like hemagglutinin of *Escherichia coli* 075 strains. **Infection and immunity**, v. 46, n.2, p. 401-407, 1984.

VAN LOY, C. P.; SOKURENKO, E. V.; MOSELEY, S. L.; The major structural subunits of Dr and F1845 fimbriae are adhesions. **Infection and immunity**, v.70, n. 4, p. 1694–1702, 2002.

YAMAMOTO, T.; KOYAMA, Y.; MATSUMOTO, M.; SONODA, E.; NAKAYAMA, S.; UCHIMURA, M.; PAVEENKITTIPORN, W.; TAMURA, K.; YOKOTA, T.; ECHEVERRIA, P. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 166, p. 1295–1310, 1992.

YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 12, p. 85–90, 1995.

YAMAMOTO, T.; WAKISAKA, N.; NAKAE, T.; KAMANO, T.; SERICHANTALERGS, O.; ECHEVERRIA, P. Characterization of a novel hemagglutinin of diarrhea-associated *Escherichia coli* that has characteristics of diffusely adhering *E. coli* and enteroaggregative *E. coli*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3694–3702, 1996.

ZAMBONI, A.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 1058-1063, 2004.

ZHANG, L.; FOXMAN, B.; TALLMAN, P.; CLADERA, E.; LE BOUGUENEC, C.; MARRS, C. F. Distribution of *drb* genes coding for Dr binding adhesins among uropathogenic and fecal *Escherichia coli* isolates and identification of new subtypes **infection and immunity**, v. 65, n. 6, p. 2011–2018, 1997.

