



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

RAFAEL VENTIN DA SILVA

***Escherichia coli* diarreiogênica isoladas de alimentos de origem animal induzem lesão *attaching and effacing*.**

SALVADOR

2017

RAFAEL VENTIN DA SILVA

***Escherichia coli* diarreiogênica isoladas de alimentos de origem animal induzem lesão *attaching and effacing*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Alaíse Gil
Guimarães

SALVADOR

2017

da Silva, Rafael Ventin
Escherichia coli diarreiogênica isoladas de alimentos de
origem animal induzem lesão attaching and effacing. / Rafael
Ventin da Silva. -- Salvador, 2017.
52 f. : il

Orientadora: Aláise Gil Guimarães.
Coorientador: Mauricio Costa Alves da Silva.
Dissertação (Mestrado - Ciência de Alimentos) --
Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, 2017.

1. DTA. 2. EPEC. 3. Virulência. 4. astA. 5. paa. I.
Guimarães, Aláise Gil. II. da Silva, Mauricio Costa Alves. III.
Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

RAFAEL VENTIN DA SILVA

Escherichia coli DIARREIOGÊNICA ISOLADAS DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL INDUZEM LESÃO ATTACHING AND EFFACING

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 17 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Aláise Gil Guimarães
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr. Cleber Alberto Schmidt
Universidade Federal da Bahia

Dr^a. Paula Carvalho Lage von Buettner Ristow
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família que muito me apoiou, incentivou e investiu nessa jornada comigo. À Aldina, minha amada mãe e incansável revisora, ao meu pai Sergio, meu querido irmão Felipe, à minha sempre compreensiva, batalhadora e amada Clarinha, meus inspiradores tios, Chico e Myriam, meu primo Bernardo e aos demais amigos.

À minha orientadora, professora Dra. Alaíse Gil Guimarães, e todos os colegas do Laboratório de Estudos em Microbiologia de Alimentos (LEMA) pelo imensurável apoio.

À equipe da Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), em nome da Dra. Marília Lima, por me receber, pela contribuição e colaboração com as amostras pesquisadas.

Ao grande amigo e professor Dr. Mauricio Costa Alves da Silva, principal responsável pelo embrião e amadurecimento dessa pesquisa, sempre disponível e dedicado para a concretização dos objetivos, não importando quantas folhas fossem necessárias rasurar.

Agradecimento especial aos meus amigos que me acolheram em Botucatu (SP) e foram a minha família durante o período longe de casa, tornando tudo mais fácil para mim. Everton e Felipe, grandes irmãos que, apesar do curto período, deixam saudades da prazerosa convivência.

Agradecimento importante, também, a todos os colegas do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências-UNESP/Botucatu, por me receberem e colaborarem da forma mais acolhedora possível. Em especial ao Dr. Rodrigo Hernandes Tavanelli, que me abriu as portas do seu laboratório sem hesitar e, gentilmente, me ensinou todos os passos dessa pesquisa e contribuiu, sem medir esforços, na condução desse trabalho, mostrando que a verdadeira ciência é mais humana que meros resultados e publicações. Às colegas Regiane e Melissa, que não descansaram (nem mesmo domingos e feriados) para que fosse possível realizar todas as etapas dessa pesquisa e tornaram a rotina de bancada no laboratório muito mais gratificante.

Por fim, à CAPES pela concessão da bolsa de estudos, à UFBA e ao PGAlí pelos ensinamentos, apoio e incentivo em todas as etapas dessa pesquisa.

DA SILVA, Rafael Ventin. *Escherichia coli* diarreio gênica isoladas de alimentos de origem animal induzem lesão *attaching and effacing*. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

RESUMO

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são um evidente problema epidemiológico e agentes bacterianos estão amplamente envolvidos em surtos de DTA. *Escherichia coli*, um microrganismo amplamente estudado, é considerado uma bactéria comensal de homens e alguns animais, entretanto, alguns isolados são considerados altamente patogênicos. O patotipo *Escherichia coli* enteropatogênico (EPEC) é reconhecido pela sua capacidade de induzir a lesão característica *attaching & effacing* (A/E) em células epiteliais. Esse patotipo é subdividido em dois subgrupos: típica (tEPEC) e atípica (aEPEC). O subgrupo aEPEC é bastante heterogêneo, pode carrear diferentes fatores de virulência pertencentes a outros patotipos de *E. coli* e representa um potencial risco para os consumidores, quando presente em alimentos. O objetivo desse estudo foi investigar as características de virulência de 109 cepas de *E. coli* isoladas de alimentos de origem animal, no Estado da Bahia, Brasil, além de investigar a capacidade dos isolados de aEPEC aderirem e promoverem a lesão A/E em células epiteliais. A classificação dos isolados de *E. coli* em diferentes patotipos de *E. coli* diarreio gênica (DEC) mostrou que, dos 109 isolados, quatro foram classificados como aEPEC. Dois (50%) dos quatro isolados de aEPEC carregavam o gene *paa* (adesina associada à EPEC porcina) e produziam fímbria tipo 1. Os quatro isolados de aEPEC apresentaram padrão de aderência indefinido em ensaios com célula HeLa e foram positivos para teste de FAS (coloração de fluorescência de F-actina), indicando a capacidade de promover acúmulo de F-actina sob o local de aderência da bactéria. Além disso, 26 dos outros 105 isolados que não apresentaram marcadores de nenhum patotipo de DEC, carregavam o gene *astA*, responsável por codificar uma enterotoxina termoestável de *E. coli* enteroagregativa (EAST1). Levando em consideração o risco associado ao consumo desses produtos inseguros, os dados obtidos no presente estudo reforçam a necessidade de um minucioso sistema de inspeção alimentar no Brasil voltado para a melhoria das condições higiênicas na cadeia de produção de alimentos.

Palavras-chave: DTA; EPEC; virulência; *astA*; *paa*

DA SILVA, Rafael Ventin. *Escherichia coli* diarreio gênica isoladas de alimentos de origem animal induzem lesão *attaching and effacing*. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

ABSTRACT

Foodborne diseases are an epidemiological evident problem, and bacterial agents are widely involved in outbreaks. *Escherichia coli*, one of the widely studied microorganism, is a human and animal commensal bacterium, although some isolates are considered highly pathogenic. The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) pathotype is known by its ability to induce the characteristic attaching & effacing (A/E) lesions on epithelial cells. It is subdivided into two subgroups: typical (tEPEC) and atypical (aEPEC). The aEPEC is a heterogeneous subgroup that may carry different virulence factors from other *E. coli* pathotypes, and represent a potential risk for consumers when present in food. The aim of this study was to investigate the virulence characteristics of 109 *E. coli* strains isolated from food of animal origin in the State of Bahia, Brazil, as well as to investigate the ability of the aEPEC isolates to adhere and promote A/E lesions on epithelial cells. The classification of the *E. coli* isolates in the distinct pathotypes of diarrheogenic *E. coli* (DEC) showed that, among 109 isolates, four were classified as aEPEC. Two (50%) of the aEPEC isolates carried the *paa* (porcine A/E-associated adhesin) gene and produced type 1 fimbriae. The four aEPEC presented an undefined adherence pattern on HeLa cells assay, and were positive in the fluorescent-actin staining (FAS) test, indicating their ability to promote F-actin accumulation underneath the adherent bacteria. Moreover, 26 of the other 105 isolates that lack DEC markers harbored the *astA* gene, responsible for encoding the Enteraggative *E. coli* heat-stable enterotoxin (EAST1). Taking into consideration the risk associated with the consumption of these unsafe food products, the data obtained in the present study reinforce the need for a detailed food inspection system in Brazil in order to improve hygienic conditions in the food chain.

Keywords: foodborne diseases; EPEC; virulence; *astA*; *paa*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA.....	11
2. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	12
2.1 Caracterização de <i>Escherichia coli</i>	12
2.2 <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas (DEC).....	13
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênia (EPEC).....	14
3. CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA DE EPEC.....	15
3.1 Lesão <i>Attaching & Effacing</i>	15
3.2 Padrões de Aderência.....	18
3.3 Marcadores adicionais de virulência.....	20
REFERÊNCIAS.....	24
 CAPITULO II: ARTIGO “Investigação de <i>E. coli</i> diarreiogênica em amostras de alimentos de origem animal revela presença de isolados capazes de induzir lesão <i>attaching and effacing</i> ”	30
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3. RESULTADOS.....	39
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) representam um grave problema de saúde pública. De 2007 a maio de 2017, o Brasil registrou 7.170 surtos dessas doenças, afetando diretamente 121.283 pessoas. Outros fatos a destacar são o elevado número de surtos sem identificação do agente etiológico, 70,6%, e a alta prevalência da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) dentre os surtos que tiveram o agente identificado. Este microrganismo é o agente etiológico mais descrito em surtos de DTA no país, envolvido em 26,4% dos casos (BRASIL, 2017).

E. coli é uma bactéria comensal do trato gastrointestinal de homens e alguns animais de sangue quente e, por isso, a maioria das cepas não são consideradas virulentas para estes hospedeiros (NATARO; KAPER, 1998). Dessa forma, quando da presença desses microrganismos nos alimentos, infere-se que o mesmo teve contato com material fecal em alguma etapa da sua produção ou armazenamento, sendo estes microrganismos considerados indicadores de contaminação fecal na rotina laboratorial de controle de qualidade de alimentos (FORSYTHE, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Apesar de ser considerado um microrganismo comensal, algumas cepas de *E. coli* possuem uma alta heterogeneidade genética e capacidade de adaptação em ambientes diversos, tornando-se patogênicas ao homem. Cepas capazes de causar doenças nos seus hospedeiros são subdividas de acordo com a localização da manifestação clínica, podendo ser diarreio gênicas (DEC) ou extra intestinais (ExPEC) (NATARO; KAPER, 1998; RUSSO; JOHNSON, 2000).

E. coli diarreio gênicas (DEC) se subdividem em seis diferentes patótipos, de acordo com os seus mecanismos de virulência: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) (KAPER, 1996; CROXEN et al., 2013).

Dentre os seis patótipos de DEC, EPEC destaca-se por ser o principal responsável por mortes decorrentes de diarreia infantil em crianças menores de cinco anos em todo o mundo (LANATA et al., 2013; PEARSON, 2016). EPEC são subdividas em EPEC típica (tEPEC) e atípica (aEPEC), sendo diferenciadas pela presença do plasmídeo EAF (pEAF) nas típicas e a sua ausência nas atípicas. Essa estrutura extra cromossômica de DNA carrega um operon (*bfp*) responsável pela expressão do “*bundle forming pilus*”, uma

adesina fimbrial do tipo IV, que participa ativamente da colonização de células do hospedeiro num padrão de aderência conhecido como aderência localizada (LA) (DONNENBERG et al., 1992; HICKS et al., 1998; TRABULSI et al., 2002; NOUGAYRÈDE et al., 2003).

A principal característica de EPEC é a produção da lesão histopatológica conhecida como *attaching & effacing* (A/E) em células epiteliais. Essa lesão é descrita pela íntima aderência da bactéria na superfície da parede celular, resultando na destruição das microvilosidades e formação de uma estrutura em forma de pedestal, rica em F-actina (VALLANCE; FINLAY, 2000; TRABULSI et al., 2002; HERNANDES et al., 2009).

Ao contrário do que ocorre no estabelecimento da lesão LA em tEPEC, os genes responsáveis pela lesão patognomônica A/E se localizam numa ilha de patogenicidade cromossômica conhecida como *locus of enterocyte effacement* (LEE). Um complexo sistema de transdução de sinais, secreção de proteínas, adesinas e outros efetores, conhecido como “sistema de secreção tipo 3” (T3SS), fundamentais para o estabelecimento da lesão, é transcrito por genes dessa região e a investigação destes genes é essencial na identificação do microrganismo estudado (McDANIEL, 1995; GAYTÁN et al., 2016).

O objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de diferentes patotipos de *Escherichia coli* diarreiogênicas dentre 109 isolados obtidos de alimentos de origem animal produzidos na Bahia, Brasil, e determinar se os isolados identificados como EPEC eram capazes de aderir e promover a lesão A/E em células epiteliais humanas.

Essa dissertação se divide em dois capítulos, sendo o primeiro estruturado em formato de revisão de literatura com abordagens epidemiológicas das DTA envolvendo *E. coli*, características de virulência específicas e adicionais de EPEC. O segundo capítulo, em estrutura de artigo, traz os resultados da presente pesquisa, material e métodos empregados, discussão confrontando diversos outros autores e as devidas conclusões sobre o tema.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a virulência de isolados de *E. coli* obtidos de alimentos de origem animal no Estado da Bahia e a capacidade de aderir e promover a lesão A/E em células epiteliais.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar os patotipos diarreiogênicos dos isolados de *E. coli*.

Pesquisar características adicionais de virulência de todos os isolados e, particularmente, dos isolados identificados como EPEC.

Avaliar a capacidade dos isolados identificados como EPEC de polimerizarem F-actina na formação da lesão A/E.

Determinar a capacidade e o padrão de aderência dos isolados identificados como EPEC em células epiteliais humanas.

CAPITULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. Situação Epidemiológica

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são definidas por “síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados” (BRASIL, 2017). Esses alimentos podem carrear microrganismos patogênicos, possivelmente advindos de falhas higiênicas de processamento, utilização de matéria prima contaminada, armazenamento ou manipulação de maneira inadequada pelo consumidor final (FORSYTHE, 2005; MAFFEI et. al, 2016).

Nos Estados Unidos, as doenças transmitidas por alimentos são as principais enfermidades e causas de mortes no país. Estima-se que 5.072 pessoas morram por ano em decorrência de doença diarreica aguda e que, dentre essas, apenas 1.498 (29,5%) possuam um patógeno associado conhecido (SCALLAN et al., 2011). Crianças menores de cinco anos são, particularmente, grandes vítimas de mortes causadas por doenças diarreioagênicas em todo o mundo (CROXEN et. al, 2013).

Surtos de DTA são caracterizados por um episódio no qual duas ou mais pessoas apresentam doenças semelhantes após consumirem alimentos contaminados de origem comum (CDC, 2015). Dentre os agentes causadores de doenças diarreicas agudas, envolvidos em surtos de DTA listados pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), incluem-se os seis diferentes patótipos de *E. coli* diarreioagênicos, dentre eles EPEC (SCALLAN et al., 2011).

Na última década, um total de 7.170 casos de surtos de DTA foram registrados no Brasil, sendo que 70,6% não tiveram o agente etiológico identificado. Dentre os surtos com agentes identificados, as bactérias são responsáveis por 95,9% dos registros e *Escherichia coli* é o principal agente causador nesses surtos de DTA, no período registrado, conforme demonstrado na Figura 1 (BRASIL, 2017). Em todo o mundo, o patótipo EPEC foi o agente bacteriano responsável pelo segundo maior número de mortes relacionadas a doenças diarreioagênicas, no ano de 2010 (OMS, 2015).

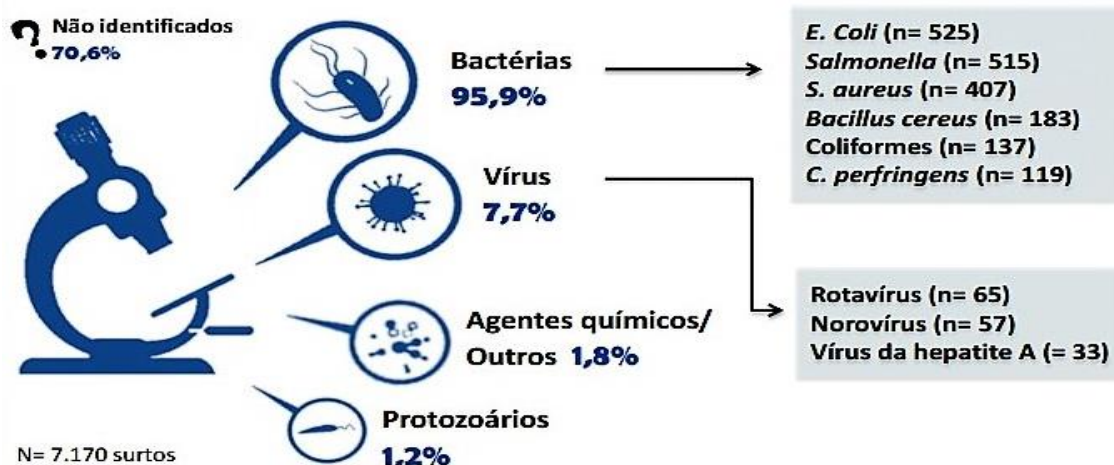


Figura 1 – Proporção de agentes etiológicos identificados em surtos de DTA, 2007 a maio de 2017. Fonte: BRASIL, 2017.

A região Nordeste registra o segundo maior número de surtos nesse período, ficando atrás apenas da região Sudeste, muito embora Mortajemi e Kaferstein (1997) destaquem que os números existentes acerca da incidência de DTA correspondem a menos de 1% da incidência real em países onde o sistema de informação é incipiente. Outro item de destaque no boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, de 2016, diz respeito aos fatores e origem dos surtos de DTA, onde aponta a manipulação e a preparação inadequada dos alimentos como principal causa da origem dos surtos, com 30% de atribuição dentre os listados (BRASIL, 2016).

2. *Escherichia coli*

2.1 Caracterização de *Escherichia coli*

Escherichia coli é um microrganismo comensal do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, pertencente à família Enterobacteriaceae. São morfológicamente caracterizados como bacilos Gram-negativos não esporulados. Bioquimicamente são fermentadores de glicose e lactose com produção de ácidos e gases, anaeróbios facultativos, catalase-positiva, oxidase-negativa e nitrato redutores. Produzem indol, mas não hidrolisam ureia. Descritos como coliformes termotolerantes ou

coliformes a 45°C, são microrganismos utilizados como indicadores higiênico-sanitários de contaminação fecal na pesquisa de alimentos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Macroscopicamente são identificados a partir do crescimento de colônias características em meio de cultura padrão (ágar Eosina azul de metileno) de cor verde ou preta, com ou sem brilho metálico (FRANCO; LANDGRAF, 2008; KONEMAN, 2017).

Apesar de serem considerados microrganismos comensais do trato gastrointestinal de humanos, algumas cepas de *E. coli* são capazes de provocar doenças nos seres humanos. Dessa forma, as cepas de *E. coli* podem ser classificadas como comensais, patogênicas entéricas (DEC) ou patogênicas extraintestinais (ExPEC), de acordo com a sua composição de genes de virulência e as suas características clínicas. ExPEC podem ser referentes a doenças do trato urinário (UPEC) e sistema nervoso central (MNEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000; KAPER et al., 2004).

2.2 *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC)

Os patógenos diarreio gênicos possuem as características de infecção: colonização da mucosa, bloqueio das defesas, multiplicação e dano ao hospedeiro. A principal característica de *E. coli* diarreio gênicas é a habilidade de colonizar a superfície da mucosa, comprometendo o peristaltismo e competindo por nutrientes com os microrganismos da microbiota intestinal (NATARO; KAPER, 1998).

As cepas diarreio gênicas de *E. coli* podem ser classificadas em seis patotipos diferentes, de acordo com as suas características de virulência e de manifestação de doença: *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC). O tamanho do genoma de cepas comensais e patogênicas difere por milhões de pares de base e esse material genético adicional pode conter inúmeros genes de virulência (KAPER, 1996; CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016).

O patotipo STEC abrange o subgrupo EHEC, ou *E. coli* enterohemorrágica, reconhecido por severos surtos em humanos, produzindo colite hemorrágica e graves complicações renais e neurológicas (FRANKEL et al., 1998). A maioria dos casos de doenças em humanos está associada ao sorotipo O157, sendo a vasta produção de subtipos

de toxina Shiga e hemolisinas, como EhxA, importantes fatores de virulência desse patotipo (CAPRIOLI et al, 2005; AFSET et al., 2006; BIELASZEWSKA et al., 2006).

Muitas das características de virulência de alguns patotipos são codificadas por genes presentes em estruturas extracromossômicas, conhecidas como plasmídeos, enquanto outras características principais de virulência de cepas de EPEC e STEC, por exemplo, são codificadas por genes localizados numa ilha de patogenicidade cromossômica, chamada “*locus of enterocyte effacement*” (LEE). Nessa região, encontram-se os genes responsáveis pela manifestação da lesão característica desses patotipos (McDANIEL, 1995; VALLANCE; FINLAY, 2000).

2.2.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC é um importante patotipo diarreiogênico de *Escherichia coli*, muito associado à diarreia infantil em países em desenvolvimento, responsável por uma alta taxa de mortalidade em crianças menores de cinco anos, e foi o primeiro patotipo de *E. coli* descrito (KAPER, 1996; KOTLOFF et al., 2013; OMS, 2015). O termo EPEC foi definido na década de 1950 para descrever cepas de *E. coli* que se distinguiam sorologicamente de outras e estavam relacionadas a surtos de diarreia infantil entre as décadas de 1940 e 1950, sendo que apenas em 1995 EPEC foi dividido em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC) (KAPER, 1996; HERNANDES et al., 2009; CROXEN et al., 2013).

Atualmente, EPEC se distingue de outros patotipos pela presença da região cromossômica LEE, sem produção de toxina Shiga, com a habilidade de induzir a lesão *attaching & effacing* (A/E) nas células epiteliais do hospedeiro (KAPER, 1996). A principal diferença entre EPEC típicas e atípicas é a presença do plasmídeo EAF (pEAF) no primeiro subgrupo e sua ausência no segundo, além de outra importante diferença que é a ampla heterogeneidade de virulência por parte das cepas de aEPEC. Enquanto cepas de tEPEC, geralmente, produzem apenas as características de virulência codificadas pelos genes da região LEE e do plasmídeo EAF, aEPEC, frequentemente, manifesta outros potenciais fatores de virulência codificados por genes não localizados em LEE e originários de outros patotipos de DEC (VIEIRA et al., 2001; TRABULSI et al., 2002; GOMES et al., 2004).

Hernandes et al., (2009) sugerem que a alta variedade de genes de virulência encontrada em aEPEC é compreensível. Uma vez que os genes que codificam fatores de virulência estão localizados em plasmídeos transmissíveis, ilhas de patogenicidade fragmentadas, transposons ou bacteriófagos, essas sequências podem ser transferidas horizontalmente para outras cepas durante a interação no intestino ou no meio ambiente. Ademais, os autores sugerem que algumas cepas de aEPEC podem simplesmente ser tEPEC que perderam pEAF ou parte dele, ou ainda EHEC que perderam os genes (ou sequências deles) que codificam a produção de toxina Shiga durante a infecção. Além das características genéticas, aEPEC também se assemelha a STEC na produção de outras toxinas, reservatórios e diferentes aspectos epidemiológicos. (TRABULSI et al., 2002; HERNANDES et al., 2009; GOMES et al., 2011).

3. Fatores de Virulência de EPEC

3.1 Lesão Attaching & Effacing (A/E)

A principal característica que define uma cepa de *E. coli* como enteropatogênica é a sua capacidade de produzir uma lesão patognomônica conhecida como *attaching & effacing* (Figura 2). A lesão é caracterizada pela aderência da bactéria ao epitélio intestinal, destruição das microvilosidades da parede celular com reorganização do citoesqueleto, acúmulo de F-actina polimerizada abaixo do sitio de ligação e formação de uma estrutura semelhante a um pedestal, onde a bactéria se liga intimamente à célula epitelial do hospedeiro (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI et al., 2002; KAPER et al., 2004).

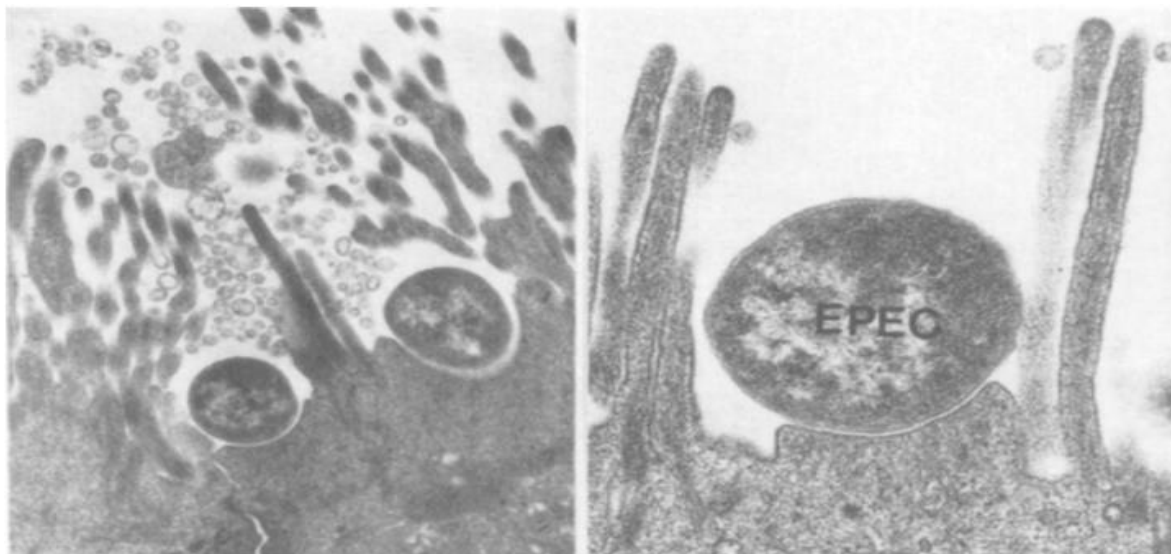


Figura 2 – Lesão *attaching and effacing* em célula intestinal com destruição das microvilosidades e reorganização do citoesqueleto (esquerda) seguido da íntima aderência bacteriana em estrutura tipo pedestal (direita). Fonte: KNUTTON, 1995.

Algumas cepas de *E. coli* são capazes de promover essa lesão, incluindo EPEC e algumas STEC, sendo então consideradas “*Attaching & Effacing Escherichia coli*” (AEEC). Ademais, alguns patógenos entéricos de humanos e animais como *Escherichia albertii* e *Citrobacter rodentium* são exemplos de outros agentes capazes de induzir essa lesão em seus hospedeiros (NATARO; KAPER, 1998; MORA et al., 2009).

A indução da doença diarreica aguda está relacionada com a perda da capacidade de absorção por parte das células intestinais, decorrente da destruição das microvilosidades e desorganização de proteínas do citoesqueleto durante a lesão A/E. A intensa perda de metabólitos e da microbiota natural do trato gastrointestinal, em consequência dessa diarreia, faz com que EPEC tenha uma ampla vantagem na colonização do hospedeiro e seja um significativo agente responsável pela morte de crianças menores de cinco anos em todo o mundo, principalmente, em países em desenvolvimento. (VALLANCE; FINLAY, 2000; KENNY, 2002; CROXEN et al., 2013).

A investigação laboratorial da habilidade de promover essa lesão, por parte de cepas de *E. coli*, é fundamental para a classificação de isolados como EPEC e pode ser demonstrado através do teste de FAS (*fluorescent actin staining*), uma técnica de coloração de filamentos de F-actina polimerizada, visualizada através de microscopia de fluorescência, onde cada ponto de intensidade fluorescente demonstra o exato ponto de

aderência da bactéria à célula epitelial (Figura 3). Por definição, esse patotipo é descrito pela habilidade de induzir a lesão A/E combinada à incapacidade de produção da toxina Shiga (KNUTTON, 1995; NATARO; KAPER, 1998; HERNANDES, et al., 2009).

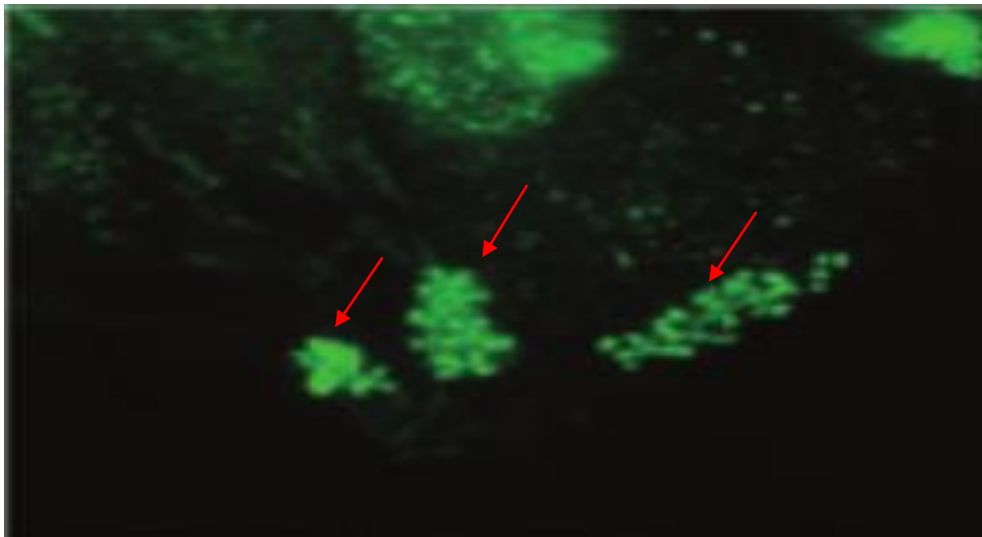


Figura 3 - FAS (*fluorescent actin staining*) demonstra a polimerização da F-actina através de intensos pontos de fluorescência no local da interação entre bactéria e célula epitelial (setas vermelhas). Fonte: HERNANDES et al., 2008.

A lesão A/E é codificada pela região LEE (*locus of enterocyte effacement*), uma conservada ilha de patogenicidade cromossômica, responsável por transcrever os genes envolvidos nessa lesão. Parte importante codificada por esse aparato de virulência é um complexo sistema denominado de T3SS (*type III secretion system*), que envolve a produção de, aproximadamente, 22 proteínas de virulência e efetores que se ligam, sinalizam, modificam e afetam estruturas da célula hospedeira, permitindo o desenvolvimento da lesão A/E (VALLANCE; FINLAY, 2000; KENNY, 2002; GAYTÁN et al., 2016).

Dentre todas as proteínas e efetores codificados pela região LEE, destaca-se a intimina, uma proteína de membrana, transcrita pelo gene *eae*, localizado no operon LEE5, responsável pela íntima aderência entre o agente bacteriano e o hospedeiro, visualizada na lesão A/E. Outro importante e complementar componente dessa lesão é a proteína Tir, transcrita pelo gene *tir*, que é produzida pela bactéria e, imediatamente,

translocada para dentro da célula hospedeira, atuando como sítio de ligação para a intimina (TRABULSI et al., 2002; ROCHA et al., 2011; GAYTÁN et al., 2016).

Outro conjunto de destaque é formado por três proteínas do complexo ATPase, responsável por fornecer energia para o funcionamento do T3SS. As proteínas EscN, EscL e EscO são interdependentes e regulam o sistema enzimático da ATP na geração da energia necessária para o estabelecimento da lesão A/E (GAUTHIER et al., 2003; GAYTÁN et al., 2016).

3.2 Padrões de aderência

Um ponto importante do estabelecimento de doenças diarreicas causadas pelos vários patótipos de DEC é a colonização do trato gastrointestinal (CRAVIOTO, 1979). EPEC típicas e atípicas diferem nos seus padrões de aderência, uma vez que tEPEC tem como característica o fato de possuir o plasmídeo EAF, responsável por conferir um padrão de aderência em células epiteliais conhecido como “aderência localizada” (LA), (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI et al., 2002), conforme demonstrado na Figura 4. Essa aderência é associada à formação de microcolônias após três horas de incubação *in vitro* e é mediada pelo *bundle-forming pilus* (BFP). BFP é considerada uma fímbria do tipo IV, expressada por um operon contendo 14 genes, presente nesse plasmídeo (pEAF) (DONNENBERG, 1992; MORA et al., 2009).

Por não possuir o plasmídeo EAF e, conseqüentemente, não produzir BFP, outras adesinas fimbriais e não fimbriais assumem a função inicial de interação entre bactéria e célula hospedeira, definindo outros padrões de aderência em aEPEC (HERNANDES et al., 2011). Geralmente, em ensaios celulares *in vitro* com seis horas de incubação, são descritos os seguintes padrões de aderência em aEPEC: aderência agregativa (AA), quando as bactérias aderem à célula epitelial como tijolos empilhados; aderência difusa (DA), quando as bactérias se aderem de maneira difusa por toda a superfície celular e, mais frequentemente observado, o padrão de aderência *like*-localizada (LAL), quando a bactéria se adere como compactos *clusters* espalhados pela superfície celular (Figura 5) (GOMES et al., 2004; MORA et al., 2009; ROCHA et al., 2011). Além disso, algumas cepas de aEPEC podem apresentar um padrão de aderência não determinado, ou até mesmo não serem aderentes às células epiteliais (CRAVIOTO, 1979; ROCHA et al., 2011; COMERY, et al., 2013; DIAS et al., 2016).

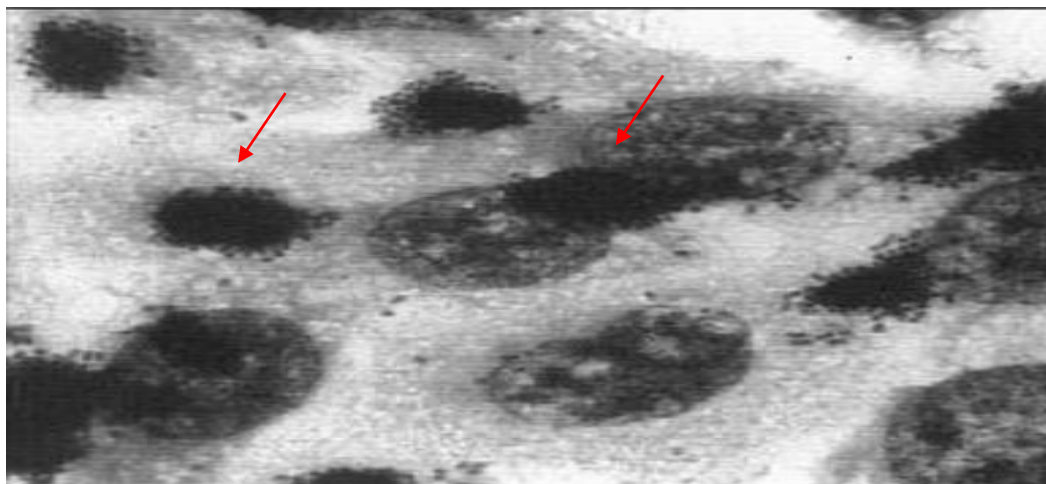


Figura 4 – Padrão de aderência localizada (LA) em tEPEC. Bactérias se agrupam em *clusters* em uma mesma região da superfície celular (setas vermelhas). Fonte: TRABULSI et al., 2002.

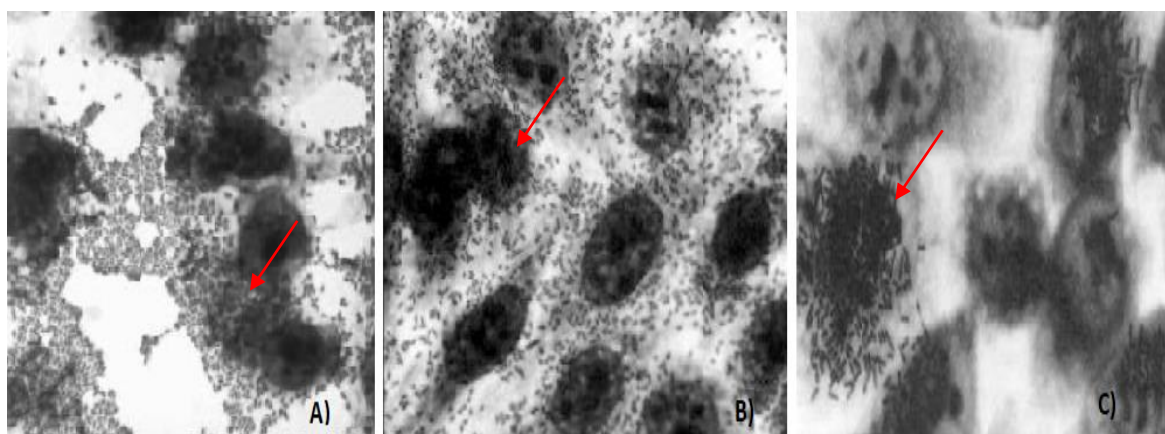


Figura 5 – Padrões de aderência de EPEC. A) Aderência agregativa (AA), B) Aderência difusa (DA), C) Aderência *like*-localizada (LAL) representadas pelas setas vermelhas. Fonte: TRABULSI et al., 2002.

Apesar das claras diferenças entre os padrões de aderência, apenas os fatores mediadores do padrão LA foram extensivamente estudados em tEPEC e pouco se sabe sobre os fatores mediadores de cada padrão de aderência em aEPEC (SCALETSKY et al., 2010). Alguns autores sugerem que o subtipo da intimina e a expressão de algumas outras adesinas são determinantes na mediação do padrão de aderência apresentado por aEPEC (PELAYO et al., 1999; TRABULSI et al., 2002; SCALETSKY et al., 2005).

A adequada avaliação do padrão de aderência é de suma importância para o diagnóstico e para a determinação da virulência de EPEC. Estudos demonstraram uma correlação significativa entre cepas de aEPEC que manifestam o padrão LAL e a doença diarreica (SCALETSKY et al., 1999).

Apesar das características celulares e ambientais influenciarem na interação com o agente bacteriano e, conseqüentemente, no padrão de aderência manifestado, ensaios celulares *in vitro* com diferentes linhagens celulares frequentemente usadas demonstram alterações pouco significativas na expressão desse fenótipo (KNUTTON, 1995; VIEIRA et al., 2001; ROCHA et al., 2011).

3.3 Marcadores adicionais de virulência

Em geral, cepas de aEPEC possuem uma alta variedade de marcadores adicionais de virulência de outros patótipos de DEC, ao contrário de tEPEC, refletindo a já mencionada alta heterogeneidade genética desse grupo (TRABULSI et al., 2002; HERNANDES et al., 2009). O fato de genes que codificam as características de virulência pertencerem a plasmídeos transmissíveis, ilhas de patogenicidade, transposons ou bacteriófagos, torna compreensível as variáveis combinações de genes de virulência encontradas em aEPEC. Além disso, a grande semelhança entre o grupo EHEC e aEPEC sugere que algumas cepas de aEPEC podem ser EHEC que perderam a sequência genética codificante para toxina Shiga (*stx*), ou até mesmo tEPEC que perderam o plasmídeo EAF ou parte dele (BIELASZEWSKA et al., 2008; HERNANDES et al., 2009).

Diversos trabalhos identificaram, em amostras clínicas, alta prevalência de um ou mais genes de virulência associados a outros patótipos de DEC em isolados de aEPEC ao redor do mundo (AFSET et al., 2006; GOMES et al., 2011; BIELASZEWSKA et al., 2008; HERNANDES et al., 2009; VIEIRA et al., 2016) e em isolados de amostras de alimentos (BADRI et al., 2009; COMERY et al., 2013; BURGOS et al., 2016; OMBARAK, et al., 2016; SEO et al., 2017). Essa caracterização molecular demonstra uma grande diversidade de fatores de virulência dentre diferentes isolados de aEPEC e indica uma variedade no potencial patogênico desses isolados (AFSET et al., 2006).

Um reconhecido fator adicional de virulência encontrado com frequência em cepas de aEPEC isoladas de alimentos é a entero-hemolisina EhxA, codificada por genes

localizados em um mega plasmídeo de STEC, responsável pela lise de hemácias (AFSET et al., 2006; XU et al., 2017).

Apesar da entero-hemolisina EhxA ser considerada um importante marcador de virulência devido à sua associação com a doença hemorrágica em humanos, o completo funcionamento dessa correlação não é bem entendido. Sabe-se, entretanto, que parte dos casos clínicos associados à STEC estão relacionados com cepas *eae* e *ehxA* positivas e que essa também é uma condição possivelmente encontrada em aEPEC (GYLES et al., 1998; AFSET et al., 2006; IRSHAD et al., 2014).

Uma vez que isolados de aEPEC estão associados à doença diarreica, essas cepas possuem determinados mecanismos de aderência à mucosa intestinal, tais como as adesinas (HERNANDES et al., 2011). Uma adesina não fimbrial relacionada a aderência inicial da lesão A/E em cepas enteropatogênicas de *E. coli* originalmente isoladas de porcos (PEPEC) e também encontrada em STEC, incluindo o sorotipo O157:H7, é a Paa (*porcine A/E-associated*) (BATISSON et al., 2003). A relevância dessa adesina está no fato de frequentemente ser encontrada em isolados de pacientes diarreicos, se comparado a indivíduos saudáveis, o que a torna potencialmente associada à doença diarreica (AFSET et al., 2006; GOMES et al., 2011). O gene responsável por codificar essa adesina (*paa*) é amplamente encontrado na caracterização molecular de cepas de aEPEC, sendo um dos marcadores de virulência mais prevalentes nesse subgrupo (HERNANDES et al., 2009; VIEIRA et al., 2016).

Algumas cepas de aEPEC possuem a capacidade de formar biofilme, uma característica de agrupamento em microcolônias que possibilita uma maior persistência da infecção, além da sobrevivência fora do ambiente do hospedeiro, como superfícies abióticas, por exemplo (Figura 6) (CULLER et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014).

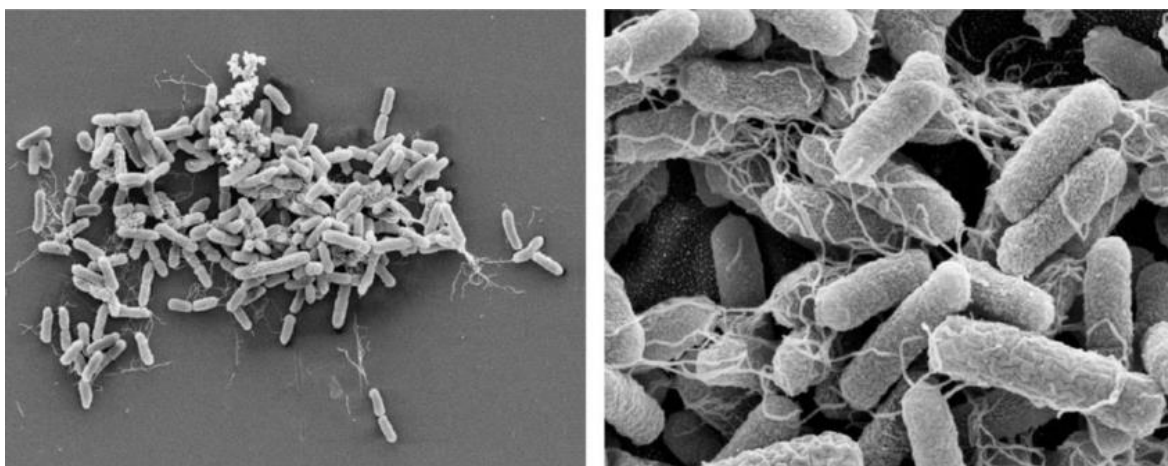


Figura 6 – Formação de biofilme por aEPEC em lamina de vidro. Fonte: NASCIMENTO et al., 2014.

A definição dos biofilmes microbianos é de uma complexa estrutura séssil agrupada em uma comunidade de células bacterianas que estão ligadas a um substrato ou interface ou uma à outra, até de maneira irreversível, incorporadas em uma matriz polimérica de substâncias extracelulares autoproduzidas, protegendo a bactéria contra efeitos deletérios de agentes antimicrobianos e do sistema imune do hospedeiro. Além dessas funções, o agrupamento em microcolônias funciona como uma ferramenta de motilidade e transferência de DNA entre os indivíduos (DONLAN; COSTERTON, 2002; BERNE et al., 2015).

As fímbrias são um variado grupo de adesinas com longos filamentos, poliméricas, presentes tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas, e que possuem função de aderência inicial a superfícies, motilidade e formação de biofilmes. Muitas espécies de bactérias possuem mais de um tipo de fímbria (BERNE et al., 2015). A síntese de fímbria tipo 1 em aEPEC está diretamente relacionada à formação de biofilmes, sendo um importante fator de virulência em cepas com essa característica (NASCIMENTO et al., 2014). Esse comportamento confere uma sobrevivência, capacidade de manutenção de crescimento bacteriano e recontaminação, quando observado em superfícies abióticas, além de garantir a conservação das características de virulência por longos períodos em doenças diarreicas persistentes *in vivo* (TOTSIKA et al., 2011; CULLER et al., 2014). A expressão da fímbria tipo 1 é dependente das condições do hospedeiro durante a infecção, como, disponibilidade de nutrientes, temperatura e outros fatores que favoreçam esse comportamento biológico (HERNANDES et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2014).

Algumas toxinas também podem ser classificadas como marcadores adicionais de virulência quando presentes em cepas de *E. coli*. EAST1 é uma conhecida enterotoxina termoestável associada a cepas de EAEC, originalmente isolada de um surto de diarreia infantil no Chile e codificada pelo gene *astA*, encontrado tanto no cromossomo bacteriano como em plasmídeos, amplamente descrita em outros patótipos de DEC e isolados de *E. coli* não classificados como DEC (SAVARINO, et al., 1991, 1996; MÉNARD; DUBREUIL, 2002; BURGOS et al., 2016). Isolados de *E. coli* positivos para *astA* são obtidos de fezes de animais sadios e doentes, principalmente bovinos e suínos, além de alimentos de origem animal e água, estando amplamente associados a doença diarreica em humanos. Apesar de, comumente, as propriedades de virulência variarem entre isolados de amostras fecais e de alimentos, muitos isolados obtidos de alimentos possuem características de virulência semelhantes a isolados fecais, sugerindo uma transmissão

através da cadeia de produção desses alimentos (DULGUER et al., 2003; VEILLEUX; DUBREUIL, 2006; BADRI et al., 2009; VIEIRA et al., 2016).

Muito embora exista uma ampla associação de EAST1 à doença diarreica, muitos isolados de *E. coli* de pacientes sadios também apresentam esse importante marcador de virulência. É possível suscitar algumas hipóteses para esse comportamento: alguns isolados podem não expressar essas características patogênicas, apesar de as possuírem; a sua expressão é insuficiente para manifestar doença em determinadas situações ou, ainda, que apenas em associação a outras características de virulência o potencial patogênico desses isolados seja aumentado (SAVARINO et al., 1996; KONNO et al., 2012). Apesar da associação entre a presença de *astA* em cepas de *E. coli* e a expressão da patogenicidade ainda não ser completamente elucidada, já existe relato de surto onde essa toxina foi o único marcador de virulência expressado no agente causador (ZHOU et al., 2002).

REFERÊNCIAS:

AFSET, J.E., BRUANT, G., BROUSSEAU, R., HAREL, J., ANDERSSSEN, E., BEVANGER, L., BERGH, K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **J. Clin. Microbiol.** 44, 3703-3711, 2006.

BADRI, S., FILLIOL, I., CARLE, I., HASSAR, M., FASSOUANE, A., COHEN, N. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from food in Casablanca (Morocco). **Food. Cont.** 20, 560-564, 2009.

BATISSON, I., GUIMOND, M., GIRARD, F., AN, H., CHENGRU, Z., OSWALD, E., FAIRBROTHER, J.M., JACQUES, M., HAREL, J. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of Attaching & Effacing *Escherichia coli*. **Infect. & Immun.** 71, 4516-4525, 2003.

BERNE, C., DUCRET, A., HARDY, G.G., BRUN, Y.V. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. **Microbiol. Spectr.** 3(4), 2015.

BIELASZEWSKA, M., FRIEDRICH ALEXANDER, W., ALDICK, T., SCHÜRKBULGRIN, R., KARCH, H. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. **Clin. Infect. Dis.** 43, 1160-1167, 2006.

BIELASZEWSKA, M., MIDDENDORF, B., KÖCK, R., FRIEDRICH, A.W., FRUTH, A., KARCH, H., SCHMIDT, M.A., MELLMAN, A. Shiga toxin-negative attaching & effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. **Clin. Infect. Dis.** 47, 208-217, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde – Vigilância Epidemiológica. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil (2017)**. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-maio-de-2017/> (Acessado em: 13/06/2017).

BRASIL. Ministério da Saúde – Vigilância Epidemiológica. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil (2016)**. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-dezembro-de-2016/> (Acessado em: 25/05/2017).

BURGOS, M.J.G., MÁRQUEZ, M.L.F., PULIDO, R.P., GÁLVEZ, A., LÓPEZ, R.L. Virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from hen eggs shells. **Int. J. of Food Microbiol.** 238, 89-95, 2016.

CAPRIOLI, A., MORABITO, S., BRUGÈRE, H., OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.** 36, 289-311, 2005.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Size and extent of foodborne outbreaks.** Atlanta, United States. (2015) Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/investigating-outbreaks/size-extent.html> (Acessado em: 23/05/2017).

COMERY, R., THANABALASURIAR, A., GARNEAU, P., PORTT, A., BOERLIN, P., REID-SMITH, R.J., HAREL, J., MANGES, A.R., GRUENHEID, S. Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at slaughter and in retail meats. **Appl. Environ. Microbiol.** 79, 3892-3896, 2013.

CRAVIOTO, A., GROSS, R.J., SCOTLAND, S.M., ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenics serotypes. **Curr. Microbiol.** 3, 95-99, 1979.

CROXEN, M.A., LAW, R.J., SCHOLZ, R., KEENEY, K.M., WLODARSKA, M., FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 26, 822-880, 2013.

CULLER, H.F., MOTA, C.M., ABE, C.M., ELIAS, W.P., SIRCILI, M.P., FRANZOLIN, M.R. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. **BioMed Res. Int.** Artigo 845147, 2014.

DIAS, R.C.B., SANTOS, B.C., SANTOS, L.F., VIEIRA, M.A., YAMATOOGI, R.S., MONDELLI, A.L., SADATSUNE, T., SFORCIN, J.M., GOMES, T.A.T., HERNANDES, R.T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agentes in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **APMIS**, 124, 299-308, 2016.

DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.** 15, 167-193, 2002.

DONNENBERG, M.S., GIRÓN, J.A., NATARO, J.P., KAPER, J.B. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Mol. Microbiol.** 6, 3427-3437, 1992.

DULGUER, M.V., FABBRICOTTI, S.H., BANDO, S.Y., MOREIRA-FILHO, C.A., FAGUNDES-NETO, U., SCALETSKY, I. C. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.** 188, 1685-1694, 2003.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRANKEL, G., PHILLIPS, A.D., ROSENSHINE, I., DOUGAN, G., KAPER, J.B., KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Eshcerichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.** 30, 911-921, 1998.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

GAUTHIER, A., PUENTE, J.L., FINLAY, B.B. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. **Infect. Immun.** 71, 3310-3319, 2003.

GAYTÁN, M.O., MARTÍNEZ-SANTOS, V.I., SOTO, E., GONZÁLEZ-PEDRAJO, B. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. **Front. Cel. and Infect. Microbiol.** 6, article 129, 2016.

GOMES, T.A.T., IRINO, K., GIRÃO, V.B., GUTH, B.E., VAZ, T.M., MOREIRA, F.C., CHINARELLI, S.H., VIEIRA, M.A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Emerg. Infect. Dis.** 10, 1851-1855, 2004.

GOMES, T.A.T., HERNANDES, R.T., TORRES, A.G., SALVADOR, F.A., GUTH, B.E.C., VAZ, T.M.I., IRINO, K., SILVA, R.M., VIEIRA, M.A.M. Adhesin-encoding genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.** 49, 3334-3337, 2011.

GOMES, T.A.T., ELIAS, W.P., SCALETSKY, I.C.A., GUTH, B.E.C., RODRIGUES, J.F., PIAZZA, R.M.F., FERREIRA, L.C.S., MARTINEZ, M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazil. J. of Microbiol.** 47S, 3-30, 2016.

GYLES, C., JOHNSON, R., GAO, A., ZIEBELL, K., PIERARD, D., ALEKSIC, S., BOERLIN, P. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like-toxin producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Appl. Environm. Microbiol.** 64, 4134-4141, 1998.

HERNANDES, R.T., SILVA, R.M., CARNEIRO, S.M., SALVADOR, F.A., FERNANDES, M.C.D., PADOVAN, A. B., YAMAMOTO, D., MORTARA, R.A., ELIAS, W.P., BRIONES, M.R.S., GOMES, T.A.T. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cell. Microbiol.** 10, 415-425, 2008.

HERNANDES, R.T., ELIAS, W.P., VIEIRA, M.A.M., GOMES, T.A.T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 297, 137-149, 2009.

HERNANDES, R.T., VELSKO, I., SAMPAIO, S.C.F., ELIAS, W.P., ROBINS-BROWNE, R.M., GOMES, T.A.T., GIRÓN, J.A. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Appl. & Environm. Microbiol.** 77, 8391-8399, 2011.

HICKS, S., FRANKEL, G., KAPER, J.B., DOUGAN, G., PHILLIPS, A.D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. **Infect. & Immun.** 66, 1570-1578, 1998.

IRSHAD, H., COOKSON, A.L., PRATTLE, D.J., DUFOUR, M., FRENCH, N.P. Distribution of *Escherichia coli* strains harbouring Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)-associated virulence factors (*stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*) from very young calves in the North Island from New Zealand. **Epidemiol. Infect.** 142, 2548-2558, 2014.

KAPER, J.B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.** 27, 130-133, 1996.

- KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.** 2, 123-140, 2004.
- KENNY, B. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. **Int. J. Med. Microbiol.** 291, 469-477, 2002.
- KNUTTON, S. Cellular response to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Bio. Report.** 15, 469-479, 1995.
- KONEMAN, E.W., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., PROCOP, G.W., WOODS, G.L., CHURCH, D.L., HALL, G.S. **Diagnostic Microbiology: Color atlas and Textbook.** 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.
- KONNO, T., YATSUYANAGI, J., SAITO, S. Virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1-harboring *E. coli* (EAST1EC) derived from sporadic diarrheal patients. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 64, 314-320, 2012.
- KOTLOFF, K.L., NATARO, J.P., BLACKWELDER, W., NASRIN, D., FARAG, T. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and Young children in developing countries (the Global Enteric Multicentre Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet.** 382, 209-222, 2013.
- LANATA, C.F., FISCHER-WALKER, C.L., OLASCOAGA A.C., TORRES, C.X., ARYEE, M.J., BLACK, R.E. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: A systematic review. **Plos One.** 8, e72788, 2013.
- PEARSON, J.S., GIOGHA, C., WONK FOK LUNG, T., HARTLAND, E.L. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. **Annu. Rev. Genet.** 50, 493-513, 2016.
- MAFFEI, D.F., BATALHA, E.Y., LANDGRAF, M., SCHAFFNER, D.W., FRANCO, B.D.G.M. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. **Brazil. J. of Microbiol.** 47S, 99-105, 2016.
- 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, 1664-1668, 1995.
- MÉNARD, L.P., DUBREUIL, J.D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit. Rev. Microbiol.** 28, 43-60, 2002.
- MORA, A. BLANCO, M., YAMAMOTO, D., DAHBI, G., BLANCO, J.E., LOPEZ, C., ALONSO, M.P., VIEIRA, M.A.M., HERNANDES, R.T., ABE, C.M., PIAZZA, R.M.F., LACHER, D.W., ELIAS, W.P., GOMES, T.A.T., BLANCO, J. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying diferente *eae* and *tir* alleles. **Int. Microbiol.** 12, 243-251, 2009.
- MORTAJEMI, Y., KAFERSTEIN, F.K. Global estimation of foodborne diseases. **W. Health Stat. Quart.** 50, 5-11, 1997.

- NASCIMENTO, H.H., SILVA, L.E.P., SOUZA, R.T., SILVA, N.P., SCALETSKY, I.C.A. Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. **BMC Microbiol.** 14, a184, 2014.
- NATARO, J.P., KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11, 142-201, 1998.
- NOUGAYRÈDE, J.P., FERNANDES, P, J., DONNENBERG, M.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell. Microbiol.** 5, 359-372, 2003.
- OMBARAK, R.A., HINENOYA, A., AWASTHI, S.P., IGUCHI, A., SHIMA, A., ELBAGORY, A.M., YAMASAKI, S. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **Int. J. of Food Microbiol.** 221, 69-76, 2016.
- OMS – WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Estimates of the global burden of foodborne diseases. **WHO Press**, Genebra, Suíça, 2015.
- PELAYO, J.S., SCALETSKY, I.C.A., PEDROSO, M.Z., SPERANDIO, V., GIRÓN, J.A., FRANKEL, G., TRABULSI, L.R. Virulence properties of atypical EPEC strains. **J. Med. Microbiol.** 48, 41-49, 1999.
- ROCHA, S.P.D., ABE, C.M., SPERANDIO, V., BANDO, S.Y., ELIAS, W.P. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be Attachin-and-Effacing negative in cultured epithelial cells. **Infect & Immun.** 79, 1833-1841, 2011.
- RUSSO, T.A., JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.** 181, 1753-1754, 2000.
- SAVARINO, S.J., FASANO, A., ROBERTSON, D.C., LEVINE, M.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in a *in vitro* rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.** 87, 1450-1455, 1991.
- SAVARINO, S.J., McVEIGH, A., WATSON, J. CRAVIOTO, A., MOLINA, J., ECHEVERRIA, P., BHAN, M.K., LEVINE, M.M., FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J. Infect. Dis.** 173, 1019-1022, 1996.
- SCALETISKY, I.C.A., PEDROSO, M.Z., OLIVA, C.A., CARVALHO, R.L., MORAIS, M.B., FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.** 67, 3410-3415, 1999.
- SCALETISKY, I.C.A., MICHALSKI, J., TORRES, A.G., DULGUER, M.V., KAPER, J.B. Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. & Immun.** 73, 4753-4765, 2005.

- SCALETISKY, I.C.A., ARANDA, K.R.S., SOUZA, T.B., SILVA, N.P. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in Hep-2 cells. **J. Clin. Microbiol.** 48, 302-306, 2010.
- SCALLAN, E., GRIFFIN, P.M., ANGULO, F.J., TAUXE, R.V., HOEKSTRA, R.M. Foodborne Illness Acquired in the United States – Unspecified Agents. **Emerg. Infect. Dis.** 17, 16-22, 2011.
- SEO, D.J., CHOI, S., JEON, S.B., JEONG, S., PARK, H., LEE, B., KIM, G., YANG, S., NISHIKAWA, Y., CHOIC, C. Comparative sequence analysis of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 identified in Korean and Japanese *Escherichia coli* strains. **Int. J. of Food Microbiol.** 243, 1-8, 2017.
- TOTSIKA, M., BEATSON, S.A., SARKAR, S., PHAN, M.D., PETTY, N.K., BACHMANN, N., SZUBERT, M., SIDJABAT, H.E., PATERSON, D.L., UPTON, M., SCHEMBRI, M.A. Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. **Plos. One**, 6, e26578, 2011.
- TRABULSI, L.R., KELLER, R., GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.** 6, 508-513, 2002.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4^a Ed. São Paulo: Atheneu, 2005
- VALLANCE, B.A., FINLAY, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **PNAS**. 97, 8799-8806, 2000.
- VEILLEUX, S., DUBREUIL, J.D. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. **Vet. Res.** 37, 3-13, 2006.
- VIEIRA, M.A., ANDRADE, J.R., TRABULSI, L.R., ROSA, A.C., DIAS, A.M., RAMOS, S.R., FRANKEL, G., GOMES T.A.T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.** 183, 762-772, 2001.
- VIEIRA, M.A., SANTOS, L.F., DIAS, R.C.B., CAMARGO, C.H., PINHEIRO, S.R.S., GOMES, T.A.T., HERNANDES, R.T. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhea in Brazil. **J. Med. Microbiol.** 65, 998-1006, 2016.
- XU, Y., BAI, X., JIN, Y., HU, B., WANG, H., SUN, H., FAN, R., FU, S., XIONG, Y. High prevalence of virulence genes in specific genotypes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 7, article 109, 2017.
- ZHOU, Z., OGASAWARA, J., NISHIKAWA, Y., SETO, Y., HELANDER, A., HASE, A., IRITANI, N., NAKAMURA, H., ARIKAWA, K., KAI, A., KAMATA, Y., HOSHI, H., HARUKI, K. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). **Epidemiol. Infect.** 128, 363-371, 2002.

Investigação de *E. coli* diarreiogênica em amostras de alimentos de origem animal revela presença de isolados capazes de induzir lesão *attaching and effacing*.

Investigation of diarrheagenic *E. coli* in food samples of animal origin reveals the presence of isolates capable of inducing attaching and effacing lesions.

Rafael V. Da Silva¹, Melissa A. Vieira², Regiane B. Dias², Rodrigo T. Hernandez², Alaíse G. Guimarães^{1*}

¹ Laboratório de Estudos em Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia - UFBA, Avenida Adhemar de Barros, S/N, Ondina, 40170-115 Salvador (BA). Brasil.

² Departamento de Microbiologia e Imunologia. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Botucatu (SP), Brasil.

*Autor para correspondência: Alaíse G. Guimarães (alaise@ufba.br).

Endereço: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, S/N, Ondina, 40170-115 Salvador (BA). Brasil.

Telefone: +55 71 32836920

ABSTRACT

The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) pathotype is known by its ability to induce the characteristic attaching & effacing (A/E) lesions on epithelial cells. It is subdivided into two subgroups: typical (tEPEC) and atypical (aEPEC). The aEPEC is a heterogeneous subgroup that may carry different virulence factors from other *E. coli* pathotypes, and represent a potential risk for consumers when present in food. The aim of this study was to investigate the virulence characteristics of 109 *E. coli* strains isolated from foods of animal origin in the State of Bahia, Brazil, as well as to investigate the ability of the aEPEC isolates to adhere and promote A/E lesions on epithelial cells. The classification of the *E. coli* isolates in the distinct pathotypes of diarrheogenic *E. coli* (DEC) showed that, among 109 isolates, four were classified as aEPEC. Two (50%) of the aEPEC isolates carried the *paa* (porcine A/E-associated adhesin) gene and produced type 1 fimbriae. All of the four aEPEC presented an undefined adherence pattern on HeLa cells assay, and were positive in the fluorescent-actin staining (FAS) test, indicating their ability to promote F-actin accumulation underneath the adherent bacteria. Moreover, 26 of the other 105 that lack DEC markers harbored the *astA* gene, responsible for encoding the Enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin (EAST1). The data obtained in the present study reinforce the need for a detailed food inspection system in Brazil in order to improve hygienic conditions in the food of animal origin chain.

Keywords: foodborne diseases; EPEC; virulence; *astA*; *paa*.

1. Introduction

Foodborne infectious diseases caused by bacterial agents are highly relevant in developing countries. *Escherichia coli* is one of the most studied agents involved in foodborne disease. It is considered a potential pathogenic microorganism, and can be related to fecal contamination when present in foods (Nataro and Kaper, 1998; Lee et al., 2012).

E. coli comprises commensal microorganisms from gastrointestinal human and animal tracts, and the majority of strains can be classified as non-virulent. Although, due to genetic heterogeneity and easy adaptation in diverse environment, many strains became highly pathogenic and evolved the ability to generate disease at the gastrointestinal and urinary tract, as well as sepsis/meningitis (Nataro and Kaper, 1998; Russo and Johnson, 2000).

Diarrheagenic *E. coli* (DEC) is classified into six distinct pathotypes according to the virulence mechanisms used to colonize and damage the host. These are: enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), diffuse-adherent *Escherichia coli* (DAEC) and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), the latter includes the important subgroup named enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) (Kaper, 1996; Croxen et al., 2013).

Epidemiologically, EPEC is commonly isolated from foods of animal origin around the world, showing the global distribution of this pathogen associated with foodborne diseases (Carneiro et al., 2006; Dias et al., 2012; Mohammed, 2012; Rashid et al., 2013; Maluta et al., 2014). EPEC is considered the main bacterial agent responsible for childhood diarrhea in the world, resulting in significant morbidity and mortality (Lanata et al., 2013; Pearson, 2016).

The EPEC pathotype is defined as *E. coli* isolates that produce the characteristic histopathologic lesion on intestinal cells known as attaching and effacing (A/E) and lack *stx* genes. This lesion is characterized by the intimate adherence of the bacterium to the surface of the infected host cell with the destruction of their brush border forming a pedestal-like structures rich in F-actin (Vallance and Finlay, 2000; Trabulsi et al., 2002; Hernandez et al., 2009). Genes responsible for encoding proteins necessary for the establishment of the A/E lesion are located in a chromosomal pathogenicity island known as locus of enterocyte effacement (LEE). The effector proteins, encoded by genes located in LEE, are translocated to host cells using a type III secretion system (T3SS) machinery. They interfere with several functions of the host cells and promote the accumulation of F-actin underneath the adherent bacteria. The investigation of these genes is a key to ensure the identification of these microorganisms (McDaniel, 1995; Gaytán et al., 2016).

Two decades ago, EPEC was divided into two groups: typical EPEC (tEPEC) and atypical EPEC (aEPEC), differentiated basically by the presence of the EAF (*E. coli adherence factor*) plasmid (pEAF) in the first group, and its absence in aEPEC isolates (Kaper, 1996). This plasmid harbors a set of genes responsible for encoding proteins that are necessary for the biogenesis of the BFP (Bundle forming-pilus), a type IV pilus, associated with the localized adherence (LA) phenotype (Scaletsky et al., 1984; Donnenberg et al., 1992). This pattern of adherence is characterized by the formation of compact microcolonies attached to one or a few small areas of the epithelial cells (HeLa or Hep-2). Instead of LA, the majority of the aEPEC isolates produces the localized adherence-like (LAL) that is characterized by the presence of less-compact microcolonies and can be only observed in assays performed with prolonged incubation periods (Rodrigues et al., 1996; Vieira et al., 2001, Abe et al., 2009). On the other hand, some

aEPEC isolates can produce aggregative (AA) or diffuse (DA) adherence, when in contact with epithelial cells cultured *in vitro* (Vieira et al., 2001).

Besides the LEE region, some EPEC isolates, mainly aEPEC, can carry additional virulence-associated genes previously identified in other DEC pathotypes or ExPEC. The horizontal acquisition of genes can be responsible for the high heterogeneity found among these pathogens (Savarino, 1996; Vieira et al., 2001; Hernandez et al., 2009; Gomes et al., 2011; Vieira et al., 2016).

The aim of this study was to investigate the occurrence of distinct DEC pathotypes among 109 *E. coli* isolates obtained from food of animal origin in the state of Bahia, Brazil, and further investigate the ability of the EPEC isolates to adhere and promote A/E lesion on infected epithelial human cells.

2. Materials and methods

2.1 *E. coli* strains

One hundred and nine *E. coli* isolates were obtained from different foods from inspection routine by the Defense Agency of Bahia (Agência de Defesa Agropecuária da Bahia - ADAB), the official department of sanitary control in the State of Bahia, Brazil. The food samples of animal origin involved in this study were divided into three different groups: bovine, porcine and chicken meat products (A) (n=63), seafood (B) (n=25) and dairy products (C) (n=21). All the *E. coli* strains used in the present study were grown on EMB (Eosine methylene-blue agar) (Merck, Darmstadt, Germany) and evaluated by conventional biochemical assays for *E. coli* identification in Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Brazil (Koneman, 2017).

2.2 DEC pathotypes identification and occurrence of additional virulence factor-encoding genes among *E. coli* isolates

This step was realized in Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, São Paulo. *E. coli* isolates were tested for the occurrence of genes frequently used for identification of distinct DEC pathotypes such as: aEPEC (*escN* and *eae*), tEPEC (*bfpB*), STEC (*stx1*, *stx2* and *stx2f*), ETEC (*elt* and *est*), EIEC (*ipaH*), DAEC (*daaE*), EAEC (*aatA* and *aaiA*) employing primer and PCR conditions as described in Table 1. In all assays, the prototypes E2348/69, O157:H7 EDL 933, H10407, EDL1284, C1845 and 042 were used as positive control for EPEC, STEC, ETEC, EIEC, DAEC and EAEC respectively. *E. coli* K-12 C600 was used as negative control in all reactions (Hernandes, 2013; Dias et al., 2016).

E. coli isolates were grown in McConkey agar plates at 37°C overnight. Then, 5-10 bacterial colonies from these isolates were re-suspended in sterile water and vortexed. The suspensions were boiled for 10 minutes and centrifuged at 10.000 rpm for 1 minute. The supernatants obtained were used as DNA template in the PCR assays. The reactions were performed in the thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) using GoTaq Green master mix with 0.34 µM of each primer and 2.0 µL of supernatant, according to the instructions (Promega, Madison, WI, USA). Additionally, *astA* gene was investigated by PCR as described above, in all strains. After pathotype identification, specific virulence markers were investigated in those strains classified as EPEC: toxins (*ehxA* and *cdt*), adhesins (*efa1*, *paa* and *iha*) and non-LEE effectors (*nleB* and *nleE*), as described in Table 1.

The visualization of PCR products was made after eletrophoresis in 1% or 2% agarose gel in a Tris-borate-EDTA (TBE) buffer, stained with SYBR Safe DNA Gel Stain

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The amplicons were identified based on the expected size described in Table 1.

Table 1 - Primers used in pathotype identification, additional virulence markers and conditions of PCR.

Target gene	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)	Reference
Pathotype identification				
<i>escN</i>	CGACGACTATTGCAGAGT GCCTTATCTGCTTCAGGA	50	223	<i>Hernandes, 2013</i>
<i>eae</i>	CTGAACGGCGATTACGCGAA CCAGACGATACGATCCAG	52	917	<i>Reid et al., 1999</i>
<i>bfpB</i>	GACACCTCATTGCTGAAGTCG CCAGAACACCTCCGTTATGC	63	910	<i>Müller et al., 2007</i>
<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	52	180	<i>Paton & Paton, 1998</i>
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	49	255	<i>Paton & Paton, 1998</i>
<i>stx2f</i>	AGATTGGGCGTCATTCACTGGTT G TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	57	428	<i>Schmidt et al., 2000</i>
<i>elt</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	50	322	<i>Schultsz et al., 1994</i>
<i>est</i>	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	52	190	<i>Aranda et al., 2007</i>
<i>ipaH</i>	GTTCCCTGACCGCCTTCCGATAC CGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAG TAC	52	619	<i>Toma et al., 2003</i>
<i>daaE</i>	CACTGTGGGCTCCGCGCAAGC CGGTGAGGTTTCAGTGTGTAT	57	419	<i>Campos et al., 1999</i>
<i>aatA</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	55	630	<i>Schmidt et al., 1995</i>
<i>aaiA</i>	CCCACGACCAGATAACG GTTTTTCAGGATTGCCATTAG	50	476	<i>Dudley, 2006</i>
Additional virulence markers				

<i>astA</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	57	111	<i>Yamamoto & Echeverria, 1996</i>
EPEC virulence factors				
<i>ehxA</i>	GCATCATCAAGCGACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	50	534	<i>Paton & Paton, 1998</i>
<i>efaI</i>	AAGGTGTTACAGAGATTA TGAGGCGGCAGGATAGTT	50	268	<i>Nicholls et al., 2000</i>
<i>cdt</i>	GAAARTAAATGGAAYAYAMATG TCCG AATCWCCWRSAAATCATCCAGTTA	43	466	<i>Tennant et al., 2009</i>
<i>paa</i>	GGATCCATGAGGAACATAA CTCGAGAGTGCCTTTCCTGG	52	605	<i>Batissou et al., 2003</i>
<i>iha</i>	CAGGTCGGGGTTACCAAGT CAAATGGCTCTCTTCCGTCAATG C	48	925	<i>Szalo et al., 2002</i>
<i>nleB</i>	GGTGTGCTGGTAGATGGA CAGGGTATGATTCTTGTTTATG	50	175	<i>Afset et al., 2006</i>
<i>nleE</i>	CTAATACTCAGGGCGTGTC ACCGTCTGGCTTTCTCGTTA	50	192	<i>Afset et al., 2006</i>

2.3 Type 1 fimbriae investigation

In the EPEC isolates, yeast cell agglutination assays were performed in order to detect type 1 fimbriae production. The isolates were incubated in LB (Luria-Bertani) broth at 37°C overnight. After that, agglutination assays were performed by mixing a suspension of grown bacterial aliquot in LB broth with an equal volume of yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) diluted in phosphate buffered saline (PBS) on a clean glass slide. Positive tests for detection of type 1 fimbriae were considered by visual observation of bacterial-yeast aggregation, as previously described by Totsika et al. (2011).

2.4 Adherence assays

The EPEC adherence pattern assay was evaluated in epithelial cells, as previously described by Cravioto (1979) with some adaptations. The HeLa cells were cultivated in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), and in the presence of 1% antibiotic mixture (PenStrep; Gibco, Carlsbad, USA), in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. HeLa cells were cultivated in 24-well tissue culture plates containing glass coverslips in the presence of 1 mL of the same media described above, until reach approximately 70% confluence. After washing with phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4), 1 mL of fresh medium (DMEM supplemented with 2% fetal bovine serum and 1% of D-mannose; Sigma, Saint-Louis, MO, USA) was added to cell monolayers. EPEC strains were grown overnight in LB broth at 37°C, and 20 µL of bacterial suspension was added to cell monolayers, and the plates incubated at 37°C. After 3h of interaction, the preparation was washed with PBS. Fresh medium was added to the wells, and the assay was re-incubated for additional 3h. After six washes to remove unbound bacteria, the preparations were fixed with methanol and stained with May Grünwald-Giemsa to mount on a clean glass slide and examined by oil immersion light microscopy. For positive adherence controls, tEPEC 2348/69 was used to determine the *localized-adherence* (LA) pattern; aEPEC JPN15 was used to determine the *localized adherence-like* (LAL), and EAEC 042 to determine the *aggregative-adherence* pattern. *E. coli* C600 was used as negative control.

2.5 Fluorescent-actin staining (FAS) test

EPEC strains were examined by FAS test in HeLa cells. The preparations were washed six times with PBS, fixed overnight with 3% formaldehyde and permeabilized with 1% Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, MO, USA) for 5 minutes. Then, cells were

washed with PBS and incubated with Alexa Fluor 488 phalloidin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), diluted 1:125 in PBS in a dark chamber for 20 minutes. The coverslips were washed with PBS three times, placed inverted onto glass slides with glycerol and examined by incident fluorescence microscopy. Host cells and adherent bacteria were visualized by DAPI staining of the same microscope fields (Knutton et al., 1989).

3. Results

Among the 109 *E. coli* isolates analyzed, 4 (3.7%) were identified as atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) through detection of the *escN* and *eae* genes, with the exception of one isolate that was negative for the *eae* gene in the PCR assay (Figure 1). The other 105 were negative for all DEC markers investigated, and not classified in any of the DEC pathotypes. Among the four EPEC strains, *paa* gene and type 1 fimbriae production were detected in 2 (50%) of them (Table 2). The *astA* gene was detected in twenty-six (23.85%) *E. coli* among the non-pathotype identified isolates. No other pathotypes and additional virulence factors were identified among all the 109 samples involved in this study (Table 3).

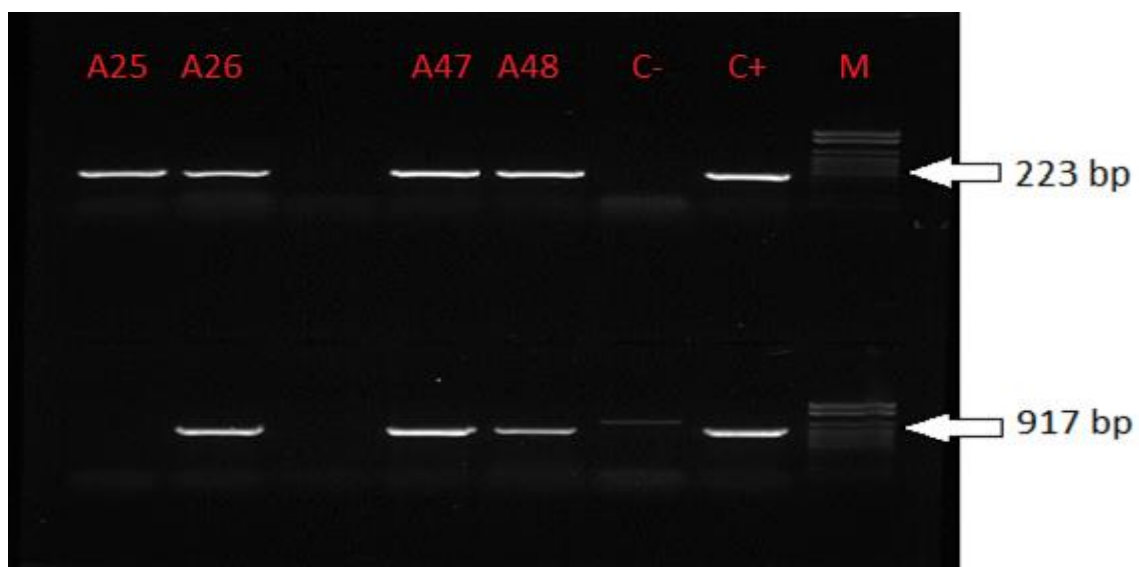


Figure 1 – PCR assay for *escN*, 223bp (above) and *eae*, 917bp (below) genes.

Analyzing the type of food studied, a total of four identified EPEC belonged to meat products group, whereas 24 (38.1%) *E. coli* isolates carrying the *astA* gene belonged to the meat products group, 1 (4%) from seafood and 1 (4.8%) belonged to dairy products group (Table 3).

All aEPEC strains were able to adhere to HeLa cells, although no defined pattern of adherence could be determined even in assays performed with 6 hours of bacteria-cells interaction (Figure 2). Moreover, strains have shown the ability to promote F-actin accumulation underneath adherent bacteria (Figure 3). This indirectly indicates the ability of these isolates to induce A/E lesions on the infected cells (Table 2).

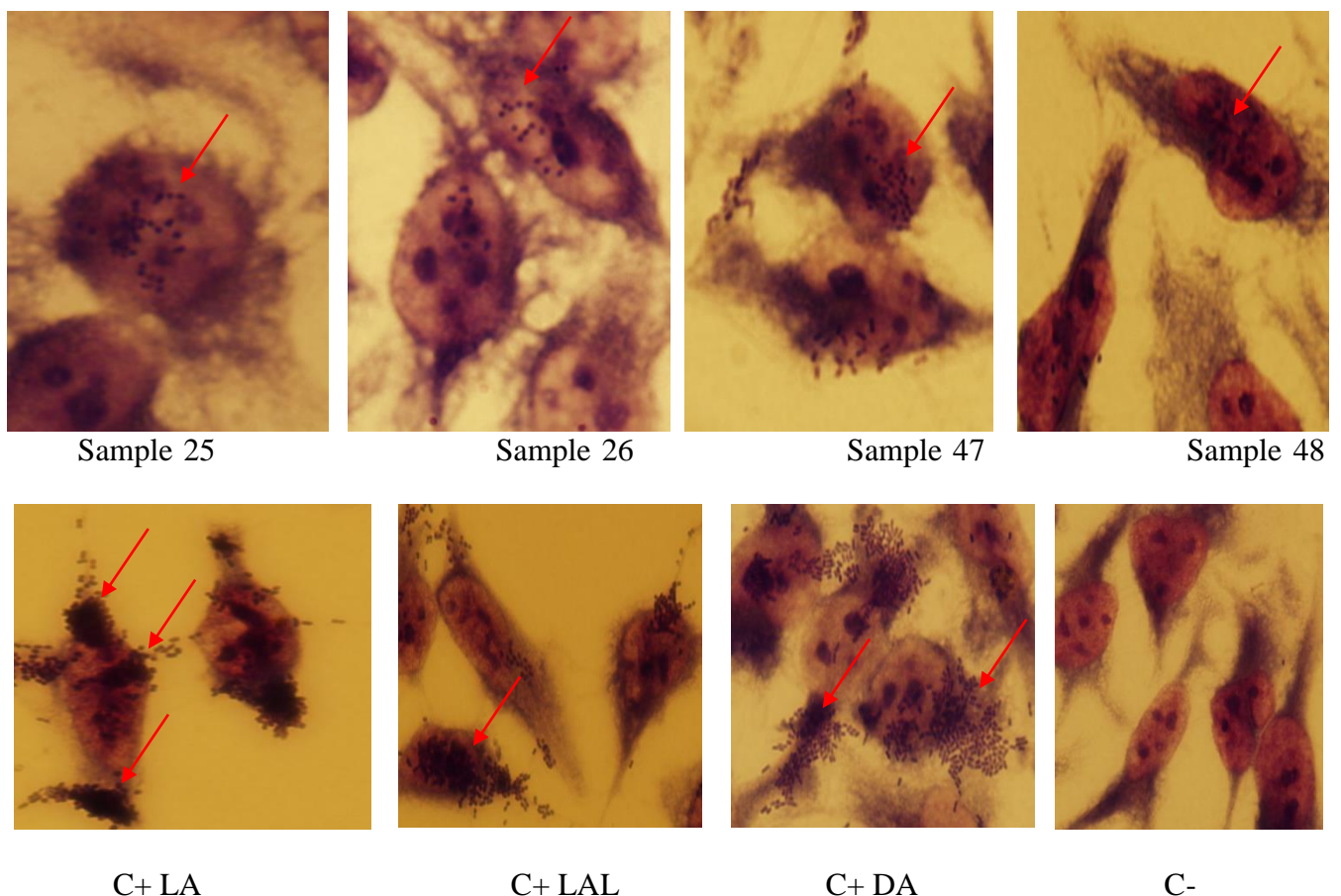


Figure 2 – Undefined adherence pattern on HeLa cells for each aEPEC strain and positive controls for localized-adherence pattern (E2348/69), localized adherence-like (JPN15), diffuse adherence (042) and negative control (K-12 C600) indicated by red arrows.

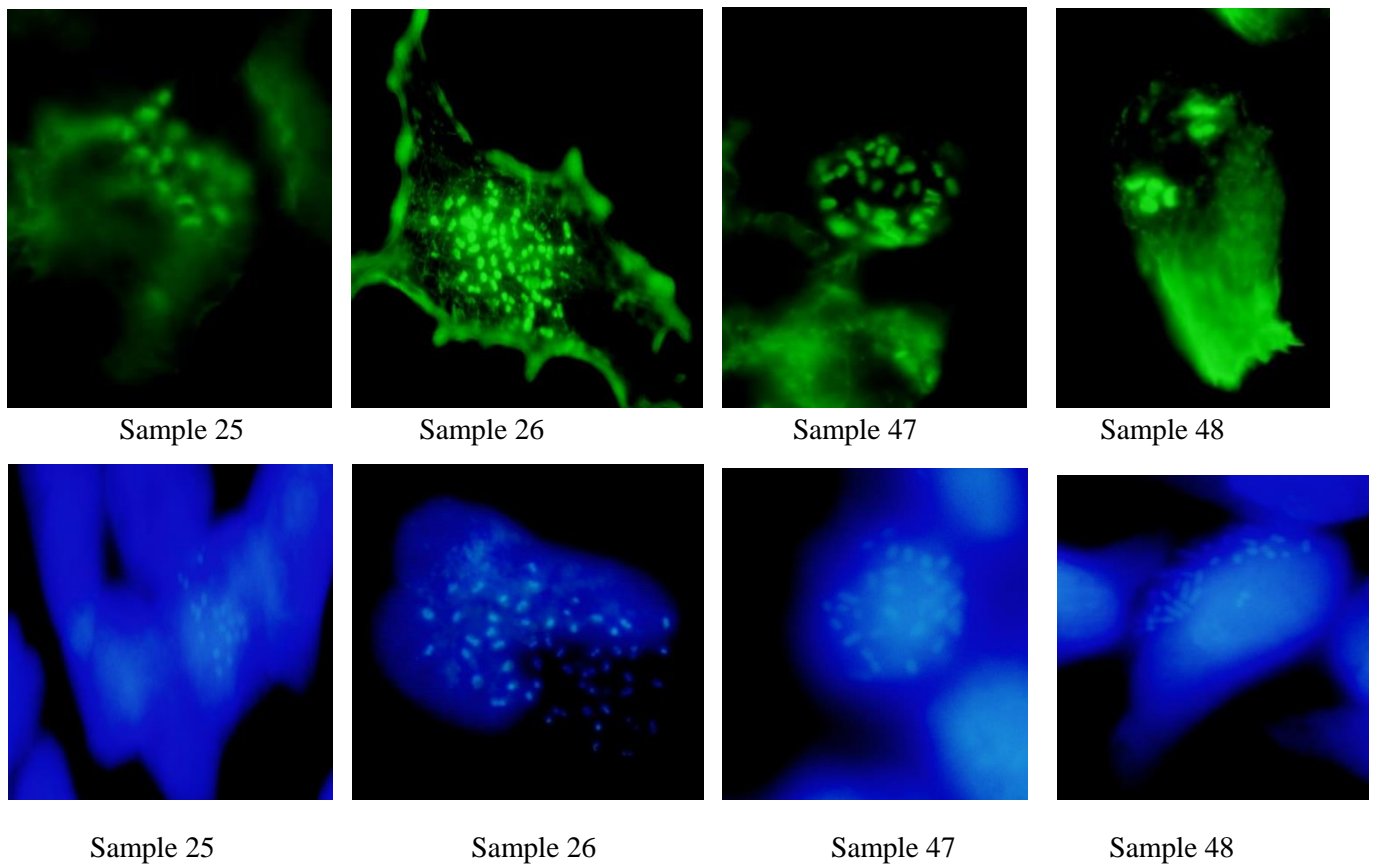


Figure 3 – FAS and DAPI test indicating ability of each aEPEC strain to induce A/E lesion.

Table 2 – Detection of additional virulence markers of aEPEC strains, pattern of adherence in HeLa cells and FAS tests.

Virulence factor	aEPEC sample 25	aEPEC sample 26	aEPEC sample 47	aEPEC sample 48
<i>ehxA</i>	-	-	-	-
<i>cdt</i>	-	-	-	-
<i>paa</i>	-	-	+	+
<i>efa1</i>	-	-	-	-
<i>iha</i>	-	-	-	-
<i>nleB</i>	-	-	-	-
<i>nleE</i>	-	-	-	-
Type 1 fimbriae	-	-	+	+
Adherence pattern in HeLa cell	UD	UD	UD	UD
FAS Test	+	+	+	+

UD: Undefined pattern, (-): negative, (+): positive

Table 3 – Total of pathotype and virulence markers identified distributed by type of food of animal origin.

Pathotype identified	Group A (%) n=63	Group B (%) n=25	Group C (%) n=21	Total (%) n=109
aEPEC	4 (6.3)	-	-	4 (3.7)
tEPEC	-	-	-	-
STEC	-	-	-	-
ETEC	-	-	-	-
EIEC	-	-	-	-
DAEC	-	-	-	-
EAEC	-	-	-	-
Virulence markers				
<i>astA</i>	24 (38.1)	1 (4)	1 (4.8)	26 (23.85)

Group A: Meat products; Group B: Seafood; Group C: Dairy products, (-): negative.

4. Discussion

Many studies around the world have described EPEC as an important pathotype of *Escherichia coli* involved in foodborne disease (Carneiro et al., 2006; Mohammed, 2012; Rashid et al., 2013). There are many points between production and consumption at which food can be contaminated by this microorganism, as described by Maluta et al., (2014). These authors found a higher prevalence of aEPEC in carcasses from a brazilian abattoir in the state of São Paulo (10%). Likewise, Monaghan et al. (2012), found prevalence of EPEC at Irish abattoirs, although at lower rates (0.7%). Abattoirs are part of the initial processing stage of food chain production, where all products should be hygienically safe and submitted to a careful and detailed official sanitary inspection.

An important point of our study was the origin of the samples, which came from the State Official Food Inspection Agency of Bahia. A previous study in Rio de Janeiro,

Brazil, reinforced the importance of food regular inspection. Comparing the incidence of EPEC in commercialized handmade dairy products without any surveillance and soft cheese from sanitary inspection, the authors found 12.5% of incidence of EPEC in handmade samples and none positive isolate in soft cheese from sanitary inspection, in contrast, we found all EPEC isolates from foods with official sanitary inspection (Dias, et al., 2012). On the other hand, our study did not also find enteropathogenic *E. coli* among dairy products group, in contrast with these authors.

The present prevalence of EPEC in food of animal origin was higher than in studies in Colombia (0%) (Rúgeles, et al., 2010), South Korea (0.6%) (Koo et al., 2012), Ireland (0.7%) (Monaghan et al., 2012) and especially higher than in bovine, porcine and chicken meat products in Canadá (2.6%) (Comery et al., 2013).

EPEC prevalence in food of animal origin was partially similar in Jammu region, India (Rashid et al., 2013), where a higher prevalence in chicken meat and dairy products was found, like in the present study (4%). In Egypt and Morocco, where the authors suggested inadequate industrial hygiene practices and sanitation in most part of the production chain, EPEC prevalence was higher than in the present study, 6.2% and 5.5% respectively (Badri, et al., 2009; Mohammed et al., 2012). The authors suggests that Morocco industrial hygiene practices are inadequate, which likely increase the risk of foodborne disease among consumers.

The genetic heterogeneity of aEPEC isolates is widely described. This group may carry genes encoding a large variety of virulence factors first described in another DEC pathotypes or ExPEC (Gomes et al., 2004; Hernandes et al., 2009). For bacterial pathogens infecting mucosal tissues like the gastrointestinal tract, several adhesins have been considered as important determinants of virulence. Especially in aEPEC, some fimbrial and non-fimbrial adhesins have been described to support the initial bacterial-

cell interaction, replacing the function of structures produced by bundle-forming pilus in the tEPEC (Hernandes, 2011). The Paa (porcine A/E-associated adhesin), encoding by *paa* gene, have been frequently detected in aEPEC isolates (Comery et al., 2013; Vieira et al. 2016). Studies have shown that *paa* gene is more frequent in aEPEC isolates obtained from patients with diarrheal disease than in isolates obtained from healthy subjects (Afset et al., 2006; Gomes et al., 2011). Recently, Vieira et al. (2016), has showed that *paa* was the second most prevalent adhesin-encoding gene found among 82 aEPEC isolates obtained from faecal samples of diarrhoeic patients in Brazil. Hernandez et al. (2009) found this adhesin in almost half (49.6%) of their 117 investigated aEPEC strains from clinical samples in São Paulo, Brazil, almost the same prevalence as in this present study.

The involvement of aEPEC type-1 fimbriae in the biofilm development on abiotic surfaces was recently described (Nascimento et al., 2014). The presence of this adhesin demonstrates, *in vitro* and *in vivo*, a strong behavior to adhere these surfaces in a microcolony arrangement for a long time, and maintain their growth, viability and infectious characteristics (Totsika et al., 2011; Nascimento et al., 2014; Sakar et al., 2016). Additionally, Culler et al. (2014) also suggest that the adherence of aEPEC strains for an extended period may explain cases of persistent diarrhea, forming biofilm on the intestinal epithelium and prolonging the bacterial survival. These authors had also concluded that aEPEC strains that showed an undefined adherence pattern in epithelial cells had a high ability to form biofilm (Culler et al., 2014).

Another finding of the present study was the remarkable presence of *astA*, gene-encoding the EAST1 (a heat-stable enterotoxin produced by some EAEC) in non-pathogenic *Escherichia coli* isolates. A high prevalence of this gene in *E. coli* isolates of food origin has been reported around the world (Badri et al., 2009; Burgos et al., 2016;

Seo et al., 2017). Some studies have also demonstrated a frequent distribution of the *astA* gene among all of the DEC pathotypes, and a strong association between EAST1 and diarrhea in aEPEC strains (Savarino et al., 1996; Dulguer et al., 2003; Campos et al., 2004; Vieira et al., 2016). However, the association of *astA* presence in *E. coli* strains and the pathogenicity expression is still unclear (Hernandes et al., 2009; Burgos et al., 2016).

To confirm the potential pathogenicity of an aEPEC strain, it is paramount to demonstrate its ability to produce A/E lesion on epithelial cells (Hernandes et al., 2009). The ability of aEPEC isolates to trigger F-actin during the formation of pedestal-like structures, is an important step for the A/E lesion establishment. It can be demonstrated *in vitro* by the FAS assay on HeLa cells, indicating the association of this characteristic with diarrhea, as described by Vieira et al. (2001) and Gomes et al. (2011). On the other hand, Rocha et al. (2011) suggested that various cellular and bacterial factors are involved in the establishment of this lesion *in vitro*. For this reason, FAS test results should be considered with precaution. Although some aEPEC strains are FAS negative *in vitro*, they are potentially pathogenic since they have all attributes to cause this lesion *in vivo*.

Typical EPEC strains differ from atypical EPEC in the adherence pattern on epithelial cells. While tEPEC shows only the LA (*localized-adherence*) pattern, aEPEC may show this and other varieties of patterns on epithelial cells, probably resulting from the expression of a variety of adhesin-encoding genes under diverse environmental conditions, including distinct segments of the intestine (Trabulsi et al., 2002; Romão et al., 2014). A high prevalence of aEPEC strains with an undefined pattern of adherence to epithelial cells, like the strains in the present study, have previously been associated with diarrhea (Carneiro et al., 2006; Mora et al., 2009; Dias et al., 2016).

Despite the limited of knowledge about the factors mediating adherence in aEPEC strains, this behavior of cell colonization may not suggest a lower capacity of these

bacterial strains to induce diarrheal disease (Trabulsi et al., 2002; Scaletsky et al., 2010; Dias et al., 2016).

5. Conclusion

This study suggests that some *E. coli* isolates present in foods of animal origin may represent unknown risks for consumers. It also suggests that aEPEC, belonging to a heterogeneous bacterial group, is capable of producing A/E lesion and carrying additional virulence factors, and therefore considered dangerously diarrheagenic. These data show the relevance of food as a vehicle of pathogen transmission, and emphasize the need to implement adequate sanitary conditions and effective inspection along the food production chain. Likewise, the actual poor sanitary conditions represent a potential problem of public health in Brazil.

Conflicts of interests

The authors declare no conflict of interests.

References

- Abe, C.M., Trabulsi, L.R., Blanco, J., Blanco, M., Dahbi, G., Blanco, J.E., Mora, A., Franzolin, M.R., Taddei, C.R., Martinez, M.B., Piazza, R.M.F., Elias, W.P., 2009. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *ea*⁺EAF-negative *stx*⁻ genetic profile. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 357-365.
- Afset, J.E., Bruant, G., Brousseau, R., Harel, J., Anderssen, E., Bevanger, L., Bergh, K., 2006. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3703-3711.
- Aranda, K.R., Fabbriotti, S.H., Fagundes-Neto, U., Scaletsky, I.C., 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol. Lett.* 267, 145-150.
- Batissou, I., Guimond, M.P., Girard, F., An, H., Zhu, C., Oswald, E., Fairbrother, J.M., Jacques, M., Harel, J., 2003. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71, 4516-4525.
- Badri, S., Filliol, I., Carle, I., Hassar, M., Fassouane, A., Cohen, N., 2009. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from food in Casablanca (Morocco). *Food Control.* 20, 560-564.
- Burgos, M.J.G., Márquez, M.L.F., Pulido, R.P., Gálvez, A., López, R.L., 2016. Virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from hen eggs shells. *Int. J. of Food Microbiol.* 238, 89-95.
- Campos, L.C., Vieira, M.A.M., Trabulsi, L.R., Silva, L.A., Monteiro-Neto, V., Gomes, T.A.T., 1999. Diffusely Adhering *Escherichia coli* (DAEC) strains of fecal origin rarely express F1845 adhesin. *Microbiol. Immunol.* 43, 167-170.
- Campos, L.C., Franzolin, M.R., Trabulsi, L.R., 2004. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* serogroups – A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99, 545-552.
- Carneiro, L.A.M., Lins, M.C., Garcia, F.R.A., Silva, A.P.S., Mauller, P.M., Alves, G.B., Rosa, A.C.P., Andrade, J.R.C., Freitas-Almeida, A.C., Queiroz, M.L.P., 2006. Phenotypic and Genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogruped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk. *Int. J. of Food Microbiol.* 108, 15-21.
- Comery, R., Thanabalasuriar, A., Garneau, P., Portt, A., Boerlin, P., Reid-Smith, R.J., Harel, J., Manges, A.R., Gruenheid, S., 2013. Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at slaughter and in retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3892-3896.

- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B., 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3, 95-99.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B., 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 822-880.
- Culler, H.F., Mota, C.M., Abe, C.M., Elias, W.P., Sircili, M.P., Franzolin, M.R., 2014. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. *BioMed Res. Int.* Article 845147.
- Dias, M.T., Bricio, S.M., Almeida, D.O., Oliveira, L.A., Filippis, I., Marin, V.A., 2012. Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 32, 747-753.
- Dias, R.C., Santos, B.C., Santos, L.F., Vieira, M.A., Yamatogi, R.S., Mondelli, A.L., Sadatsune, T., Sforcin, J.M., Gomes, T.A., Hernandes, R.T., 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *APMIS.* 124, 299-308.
- Donnenberg, M.S., Girón, J.A., Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1992. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol. Microbiol.* 6, 3427-3437.
- Dudley, E.G., Thomson, N.R., Parkhill, J., Morin, N.P., Nataro, J.P., 2006. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 61, 1267-1282.
- Dulguer, M.V., Fabbriotti, S.H., Bando, S.Y., Moreira-Filho, C.A., Fagundes-Neto, U., Scaletsky, I.C., 2003. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. *J. Infect. Dis.* 188, 1685-1694.
- Gaytán, M.O., Martínez-Santos, V.I., Soto, E., González-Pedrajo, B., 2016. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Front. Cel. and Infect. Microbiol.* 6, article 129.
- Gomes, T.A.T., Hernandes, R.T., Torres, A.G., Salvador, F.A., Guth, B.E.C., Vaz, T.M.I., Irino, K., Silva, R.M., Vieira, M.A.M., 2011. Adhesin-encoding Genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. *Journ. Clin. Microbiol.* 49, 3334-3337.
- Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A.M., Gomes, T.A.T., 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 137-149.
- Hernandes, R.T., De la Cruz, M.A., Yamamoto, D., Girón, J.A., Gomes, T.A.T., 2013. Dissection of the Role of Pili and Type 2 and 3 secretion systems in adherence and

- biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. & Immun.* 81, 3793-3802.
- Kaper, J.B., 1996. Defining EPEC. *Rev. Microbiol.* 27, 130-133.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., McNeish, A.S., 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: Basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. & Immun.* 57, 1290-1298.
- Koo, H.J., Kwak, H.S., Yoon, S.H., Woo, G.J., 2012. Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1813-1816.
- Koneman, E.W., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Procop, G.W., Woods, G.L., Church, D.L., Hall, G.S., 2017. *Diagnostic Microbiology: Color atlas and Textbook*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
- Lanata, C.F., Fischer-Walker, C.L., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J., Black, R.E., 2013. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: A systematic review. *Plos One.* 8, e72788.
- Lee, D.W., Gwack, J., Youn, S.K., 2012. Enteropathogenic *Escherichia coli* outbreak and its incubation period: Is it short or long? *Osong Public Health Res. Perspect.* 3, 43-47.
- Nataro, J.P., Kaper, J. B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.
- Maluta, R.P., Fairbrother, J.M., Stella, A.E., Rigobelo, E.C., Martinez, R., Ávila, F.A., 2014. Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. *Vet. Microbiol.* 169, 89-95.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 1664-1668.
- Mohammed, M.A., 2012. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from meat products sold at Mansoura city, Egypt. *Food Control.* 25, 159-164.
- Monaghan, Á., Byrne, B., Fanning, S., Sweeney, T., McDowell, D., Bolton, D.J., 2012. Sorotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. *J. of Appl. Microbiol.* 114, 595-603.
- Mora, A., Blanco, M., Yamamoto, D., Dahbi, G., Blanco, J.E., López, C., Alonso, M.P., Vieira, M.A.M., Hernandez, R.T., Abe, C.M., Piazza, R.M.F., Lacher, D.W., Elias, W.P., Gomes, T.A.T., Blanco, J., 2009. HeLa-cell adherence pattern and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. *Int. Microbiol.* 12, 243-251.
- Müller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth A., Tschäpe, H., et al., 2007. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates

expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl. Environ Microbiol.* 73, 3380-3390.

Nascimento, H.H., Silva, L.E.P., Souza, R.T., Silva, N.P., Scaletsky, I.C.A., 2014. Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. *BMC Microbiol.* 14, 184.

Nicholls, L., Grant, T.H., Robins-Browne, R.M., 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 35, 275-288.

Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J. Clin Microbiol.* 36, 598-602.

Pearson, J.S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., Hartland, E.L., 2016. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu. Rev. Genet.* 50, 493-513.

Rashid, M.; Kotwal, S.K.; Malik, M.A.; Singh, M., 2013. Prevalence, genetic profile of virulence determinants and multidrug resistance of *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin. *Vet. World.* 6, 139-142.

Reid, S.D., Betting, D.J., Whittam, T.S., 1999. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2719-2722.

Rocha, S.P.D., Abe, C.M., Sperandio, V., Bando, S.Y., Elias, W.P., 2011. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be Attaching-and-Effacing negative in cultured epithelial cells. *Infect. Immun.* 79, 1833-1841.

Rodrigues, J., Scaletsky, I.C.A., Campos, L.C., Gomes, T.A.T., Whittam, T.S., Trabulsi, L.R., 1996. Clonal structure and virulence factor in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect. & Immun.* 64, 2680-2686.

Romão, F.T., Hernandez, R.T., Yamamoto, D., Osugui, L., Popi, A., Gomes, T.A.T., 2014. Influence of environmental factors in the adherence of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain to epithelial cells. *BMC Microbiol.* 14, 299.

Rúgeles, L.C., Bai, J., Martínez, A.J., Vanegas, M.C., Gómez-Duarte, O.G., 2010. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *Int. J. of Food Microbiol.* 138, 282-286.

Russo, T.A. & Johnson, J.R., 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181, 1753-1754.

Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M., Fasano, A., 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *Journ. Of Infect. Dis.* 173, 1019-1022.

- Scaletsky, I.C.A., Silva, M.L.M., Trabulsi, L.R., 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. & Immun.* 45, 534-536.
- Scaletsky, I.C.A., Aranda, K.R.S., Souza, T.B., Silva, N.P., 2010. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in Hep-2 cells. *J. of Clin. Microbiol.* 48, 302-306.
- Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J., Karch, H., 1995. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 33, 701-705.
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., Karch, H., 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environm. Microbiol.* 66, 1205-1208.
- Schultsz, C., Pool, G.J., Van Ketel, R., De Wever, B., Speelman, P., Dankert, J., 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2393-2397.
- Seo, D.J., Choi, S., Jeon, S.B., Jeong, S., Park, H., Lee, B., Kim, G., Yang, S., Nishikawa, Y., Choi, C., 2017. Comparative sequence analysis of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 identified in Korean and Japanese *Escherichia coli* strains. *Int. J. of Food Microbiol.* 243, 1-8.
- Szalo, I.M., Goffaux, F., Pirson, V., Piérard, D., Ball, H., Mainil, J., 2002. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. *Res. Microbiol.* 153, 653-658.a
- Tennant, S.M., Tauschek, M., Azzopardi, K., Bigham, A., Bennett-Wood, V., Hartland, E.L., Qi, W., Whittam, T.S., Robins-Browne, R.M., 2009. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC Microbiol.* 9, 117.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Gomes, T.A.T., 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 508-513.
- Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., et al., 2003. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2669-2671.
- Totsika, M., Beatson, S.A., Sarkar, S., Phan, M.D., Petty, N.K., Bachmann, N., Szubert, M., Sidjabat, H.E., Paterson, D.L., Upton, M., Schembri, M.A., 2011. Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. *Plos. One*, 6, e26578.
- Vallance, B.A. and Finlay, B.B., 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *PNAS.* 97, 8799-8806.
- Vieira, M.A.M., Andrade, J.R., Trabulsi, L.R., Rosa, A.C., Dias, A.M., Ramos, S.R., Frankel, G., Gomes, T.A.T., 2001. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry

eae and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. J. Infect. Dis. 183, 762-772.

Vieira, M.A., Santos, L.F., Dias, R.C.B., Camargo, C.H., Pinheiro, S.R.S., Gomes, T.A.T., Hernandez, R.T., 2016. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* as aetiologic agents of sporadic and outbreak-associated diarrhea in Brazil. J. Med. Microbiol. 65, 998-1006.

Yamamoto, T., Echeverria, P., 1996. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. Infect. Immun. 64, 1441-1445.