

Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil

Enteropathogenic *Escherichia coli*: a versatile diarrheagenic category

Escherichia coli enteropatogênica: una categoría diarreogênica versátil

Cintya de Oliveira Souza
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Êmily Moreira Menezes
Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, São Paulo, Brasil

Thainara Roberta Barros Melo
Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. de Azevedo, Belém, Pará, Brasil

Aline Correa de Carvalho
Faculdade Carajás, Marabá, Pará, Brasil

Caroline do Socorro Barros Melo
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Leni Célia Reis Monteiro
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

RESUMO

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) foi a primeira categoria de *E. coli* reconhecida como diarreio gênica e ainda hoje está associada a casos esporádicos e surtos de diarreia infantil. Em 1995, a EPEC foi classificada em típica e atípica e, até o momento, muito se tem pesquisado sobre as diferenças patogênicas e epidemiológicas destas duas subcategorias e sua similaridade com outras categorias. Para consolidar estas informações, a presente pesquisa avaliou 98 fontes bibliográficas, sendo 81 artigos, oito teses, quatro dissertações e cinco livros. Essa pesquisa destacou os seguintes resultados e conclusões: as EPEC típicas (EPEC-t) têm como principal reservatório os seres humanos, no entanto já foram registradas raras ocorrências em alguns animais silvestres; as EPEC atípicas (EPEC-a) são encontradas entre humanos e uma variedade de outros hospedeiros animais que podem servir de reservatório e de fonte de contaminação para o homem e o ambiente, além disso, as EPEC-a apresentam inúmeros fatores de virulência comuns e específicos de outras categorias patogênicas, sugerindo que o aumento de sua prevalência esteja relacionado ao fenômeno de interconversão; a presença da região LEE (*locus of enterocyte effacement*) completa (LEEAD) e da ilha de patogenicidade O1-122 (*efa1/lifA, nleB, nleE, set/ent*), juntamente com os genes da hemolisina (*ehxA*) e da adesina (*paa*) podem auxiliar na identificação de potenciais estirpes patogênicas de EPEC-a; a identificação conclusiva de EPEC é realizada pelo diagnóstico molecular, onde se pesquisam os genes *eae*, *EAF* e *stx*, sendo o perfil *eae*+*EAF*+*stx*− de EPEC-t e o *eae*+*EAF*−*stx*− de EPEC-a.

Palavras-chave: *Escherichia coli* enteropatogênica; Epidemiologia; Fatores de Virulência.

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo amplamente distribuída na natureza, tendo como principal habitat o trato intestinal humano e animal^{1,2,3,4,5}. A *E. coli* comensal, que faz parte da microbiota intestinal, não é patogênica e apresenta um importante papel fisiológico para o funcionamento do organismo. Existem seis categorias patogênicas de *E. coli* que causam infecção

intestinal em homens e animais, sendo denominadas de *E. coli* diarreio gênicas⁶ que são diferenciadas pela presença de fatores de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas, e classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC)^{7,8,9}.

A EPEC foi a primeira *E. coli* descoberta em 1940 e ainda hoje é considerada a mais versátil entre as categorias diarreio gênicas e uma das principais causas de diarreia em crianças menores de 5 anos de idade^{10,11,12,13}. Em 1995, a EPEC foi classificada em duas subcategorias: EPEC típica (EPEC-t) e atípica (EPEC-a). As EPEC-t são identificadas pela presença do gene *eae* (EPEC *attaching and effacing*) e plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*). As EPEC-a apresentam

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Cintya de Oliveira Souza
Instituto Evandro Chagas, Seção de Bacteriologia e Micologia
Rodovia BR 316, km 7, s/n. Bairro: Levilândia
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
Tel.: +55 (91) 3214-2116 Fax: +55 (91) 3214-2114
E-mail: cintyaooliveira@iec.pa.gov.br

o gene *eae*, porém são desprovidas do plasmídeo EAF. Tanto EPEC-t como EPEC-a devem ser desprovidas do gene *stx* (Shiga toxina) que caracteriza a STEC/EHEC¹⁴. Por muito tempo, as EPEC-t estiveram associadas à diarreia infantil, mas atualmente observa-se uma redução desta subcategoria e o aumento de isolamento de EPEC-a^{15,16,17}. Cada subcategoria é representada por diferentes sorotipos e as EPEC-t pertencem aos sorotipos: O55:H[6], O86:H34, O111:H[2], O114:H2, O119:H[6], O127:H6, O142:H6 e O142:H34, enquanto que as EPEC-a pertencem aos sorotipos: O26:H[11], O55:H[7], O55:H[34], O86:H[8], O111ac:H[8], O111:H[9], O111:H25, O119:H2, O125:H6 e O128:H2, sendo identificados mais de 200 sorotipos de EPEC-a¹⁸.

A EPEC-t representa a categoria original de EPEC com comportamento epidemiológico restrito aos seres humanos e patogenia bem definida. A EPEC-a está associada à diarreia humana tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, pode ser encontrada em diversos animais, alimentos e estar distribuída em diferentes ambientes tanto aquáticos como terrestres^{2,3,5,19}. Apesar de sua ampla distribuição e da sua comprovada participação como causa de diarreia humana, sua patogênese e via de transmissão não estão claramente estabelecidas²⁰.

O mecanismo da patogênese de EPEC é a lesão A/E (*attaching and effacing*) que envolve genes localizados na região LEE (*locus of enterocyte effacement*), considerada uma ilha de patogenidade, onde são encontrados os genes *ler* (regulador transcricional), *esp* (proteínas do sistema de secreção do tipo III), *tir* (*translocated intimin receptor* – receptor de intimina) e o gene *eae/E. coli attachment-effacement* (adesina intimina)^{21,22}. Três estágios de interação entre EPEC e a célula podem ser observados: 1) aderência localizada (AL) mediada pela fímbria BFP (*bundle-forming pilus*) e codificada pelo gene plasmidial EAF; 2) sinais de transdução; e 3) aderência íntima promovida pela intimina (gene *eae*)⁷.

Para o diagnóstico da EPEC, inicialmente realiza-se a coprocultura para o isolamento da bactéria que depois será submetida a diferentes testes complementares como: sorotipagem, ensaio de aderência com células HEp-2, prova de FAS (*fluorescent actin-staining* – coloração fluorescente à actina) e técnicas de biologia molecular (reação em cadeia mediada pela polimerase – PCR e suas variações) que amplificam genes que codificam os fatores de virulência que permitem a identificação e subclassificação de EPEC. Outros fatores de virulência que não estão envolvidos com a classificação desta categoria podem estar presentes e distribuídos entre EPEC-t e EPEC-a^{19,22,23}.

Diante das constantes pesquisas e da diversidade de questionamentos em relação à EPEC, este artigo apresenta uma consolidação de material bibliográfico publicado nas últimas duas décadas, com objetivo de proporcionar aos alunos, profissionais microbiologistas, epidemiologistas, médicos e outros da área biomédica, esclarecimentos sobre

a epidemiologia, os principais fatores de virulência e a identificação laboratorial desta importante e versátil categoria de *E. coli* diarreioagênica e suas subcategorias.

METODOLOGIA

Esta revisão consiste em uma pesquisa bibliográfica exploratória realizada em duas bases de dados científicas: *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (Medline/PubMed) e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO). Além dos artigos, teses, dissertações e livros didáticos referentes à área microbiológica foram utilizados como fontes bibliográficas. A estratégia de busca nas bases de dados foi realizada por meio da combinação dos termos "EPEC", "EPEC típica", "EPEC atípica" com os seguintes preditores em português, inglês e espanhol, "fatores de virulência", "patogenicidade", "humanos", "animais", "ambiente", "diagnóstico" e "epidemiologia". O período considerado na busca bibliográfica foi de 1992 a 2013. O critério de busca permitiu a identificação de aproximadamente 400 publicações, que foram inicialmente avaliadas quanto ao título e resumo, sendo selecionadas as que abordavam a combinação dos termos "EPEC", "EPEC típica", "EPEC atípica" com os preditores citados acima. Posteriormente, uma leitura completa das publicações pré-selecionadas foi realizada e o fator relevante para a seleção final dos artigos foi quando o conjunto composto por título, resumo, resultado e discussão forneciam informações para o esclarecimento da epidemiologia, dos principais fatores de virulência e da identificação laboratorial de *E. coli* enteropatogênica e suas subcategorias. Assim, 98 publicações foram utilizadas nesta revisão, sendo 81 artigos, oito teses, quatro dissertações e cinco livros ou capítulos de livro. Para síntese desta revisão, os resultados foram apresentados de maneira condensada na forma de quadros.

RESULTADOS

As EPEC podem ser isoladas de diferentes fontes como em: alimentos crus e processados; animais domésticos e silvestres; ambientes naturais como água, solo e areia de praia; fezes e solo de abatedouro bovino e fazendas. Observa-se, com os resultados deste levantamento, que a maioria dos artigos sobre epidemiologia não difere as EPEC em subcategoria típica ou atípica. Entre os trabalhos que fizeram esta diferenciação, pode-se observar que as EPEC-a são, constantemente, identificadas na água e com frequência em animais domésticos e silvestres, enquanto que as EPEC-t foram identificadas em raras ocorrências entre animais silvestres (como macaco de cativeiro, coite e cães) e, no ambiente aquático natural, como rios, lagoas e enseadas. Com relação à frequência em humanos, tanto a EPEC-a quanto a EPEC-t foram identificadas em crianças e adultos com diarreia aguda ou sem diarreia. Também foram identificadas poucas ocorrências de infecção concomitante com outros micro-organismos (Quadro 1).

| Fontes de isolamento | Descrição da fonte de isolamento de EPEC ¹ , EPEC-t ² , EPEC-a ³ | Referências |
|----------------------|---|---|
| Alimento | Linguiça toscana ¹ , leite pasteurizado ¹ , carne moída ¹ , alface ¹ , tomate ¹ , água de consumo ³ , leite de ovelha ³ | FRANCO ²⁴ ; SILVA et al ²⁵ ; BERBARDI et al ²⁶ ; MARTINS et al ²⁷ ; GÓMEZ-ALDAPA et al ²⁸ ; CANIZALEZ-ROMAN et al ²⁹ ; OTERO et al ³⁰ |
| Animal | Cães ^{1,2,3} , gatos ¹ , bezerras ¹ , bovinos ^{1,3} , papagaios ¹ , macacos ^{2,3} (cativo), coiotes ^{2,3} , insetos ¹ , porcos ^{1,3} , ovinos ³ , galinhas saudáveis ³ , pássaros silvestres ³ , veados ³ , cavalos ³ , pôneis ³ , alce ³ , ursos pardos ³ | SYDOW et al ³¹ ; MORATO et al ² ; CALIMAN ³² ; PEREIRA et al ³³ ; VERDIER et al ³⁴ ; TÓTH et al ³⁵ ; KNÖBL et al ³⁶ ; CARVALHO et al ³⁷ ; FÖRSTER et al ³⁸ ; FRANCO ²⁴ ; COOKSON et al ³⁹ ; FRÖHLICHER et al ⁴⁰ ; OH et al ⁴¹ ; OH et al ⁴² ; CHANDRAN e MAZUMDER ⁴³ ; BEAUDRY et al ⁴⁴ |
| Ambiente | Areia de praia ¹ , rios, lagoas e enseadas ^{2,3} , água de lastro e regiões portuárias ³ , água de consumo ¹ , fezes bovinas e solo (fazenda e abatedouro) ³ , solo ¹ , água de irrigação ¹ | PEREIRA et al ³³ ; CALIMAN ³² ; MONAGHAN et al ⁴⁵ ; IBENYASSINE et al ⁴⁶ ; SIDHU et al ⁴⁷ ; ALBERTINI ⁴⁸ ; MELO ⁴⁹ |
| Humano | Crianças e adultos com ou sem diarreia ^{1,2,3} | ORLANDI et al ⁵⁰ ; ALBERT et al ¹⁰ ; BUERIS et al ⁵¹ ; OLIVA et al ⁵² ; AFSET et al ⁵³ ; ROBINS-BROWNE et al ⁵⁴ ; JAFARI et al ⁵⁵ ; ARAUJO et al ⁵⁶ ; BENDEZÚ e HUASASQUICHE ⁵⁷ ; AFSET et al ⁵⁸ ; BLANCO et al ⁵⁹ ; COSTA et al ⁶⁰ ; SOUSA ⁶¹ |

Quadro 1 – Fontes de isolamento de EPEC

Entre os principais fatos epidemiológicos envolvendo as EPEC, observa-se: a) o aumento da ocorrência em EPEC-a e diminuição de EPEC-t entre amostras de fezes humanas, sendo relatados surtos de diarreia causada por EPEC-a em diversos países;

b) a presença de EPEC em animais domésticos evidenciando esses animais como possíveis reservatórios; e c) a classificação de EPEC-a em dois subgrupos com base na classificação sorológica (Quadro 2).

| Principais fatos epidemiológicos | Referências |
|--|---|
| Aumento da frequência de EPEC-a e diminuição de EPEC-t entre amostras humanas (fezes) | AFSET et al ⁵⁸ ; BUERIS et al ⁵¹ ; COSTA et al ⁶⁰ ; AFSET et al ⁵³ ; SHETTY et al ⁶² ; HANNAOUI et al ⁶³ ; SPANO et al ⁶⁴ ; VILCHEZ et al ⁶⁵ ; FRANZOLIN et al ⁶⁶ ; TRABULSI et al ¹⁴ |
| Surtos de EPEC-a em humanos | SAKKEJHA et al ⁶⁷ ; SHETTY et al ⁶² ; HANNAOUI et al ⁶³ ; SPANO et al ⁶⁴ ; VILCHEZ et al ⁶⁵ ; FRANZOLIN et al ⁶⁶ |
| Gatos diarreicos ou saudáveis servem de reservatório para infecções por EPEC* em humanos | MORATO et al ² |
| Cães aparentemente saudáveis, sem sintomas de colibacilose, podem servir como reservatório de EPEC* para humanos | SYDOW et al ³¹ |
| Cepas de EPEC-a podem ser classificadas em dois subgrupos: pertencentes a sorotipos clássicos, associados com diarreia; e as que são não tipáveis ou pertencem aos sorotipos não clássicos | SCALETSKY et al ⁶⁸ |

* Sem diferenciação entre EPEC típica e atípica.

Quadro 2 – Principais fatos epidemiológicos envolvendo EPEC

| Gene ou região de virulência | Especificação do fator de virulência | Frequência de EPEC atípica N°/N°* (%)** | Referências |
|------------------------------|---|---|-------------------------------|
| <i>hly</i> | Alfa-hemolisina | 31/99 (31,3) | GOMES et al ⁶⁹ |
| <i>irp2</i> | Gene que codifica uma proteína biosintética chamada <i>Yersinia</i> spp. | 31/99 (31,3) | |
| <i>ehxA/E-hly</i> | Hemolisina de EHEC (<i>EHEC hemolysin</i>) | 12/57 (21,1) | AFSET et al ⁷⁰ |
| | | 1/38 (3,0) | DULGUER et al ⁷¹ |
| | | 8/57 (14,0) | AFSET et al ⁷⁰ |
| | | 15/126 (11,9) | SCALETSKY et al ⁶⁸ |
| <i>ureD</i> | Proteína UreD associada à urease | 7/57 (12,3) | AFSET et al ⁷⁰ |
| <i>nleC</i> | <i>Non-LEE effector protein C</i> | 50/57 (87,7) | |
| <i>nleF</i> | <i>Non-LEE effector protein F</i> | 40/57 (70,2) | |
| <i>nleB</i> | <i>Non-LEE effector protein B</i> | 46/126 (36,5) | SCALETSKY et al ⁶⁸ |
| | | 23/57 (40,4) | AFSET et al ⁷⁰ |
| <i>nleE</i> | <i>Non-LEE effector protein E</i> | 46/126 (36,5) | SCALETSKY et al ⁶⁸ |
| | | 23/57 (40,4) | AFSET et al ⁷⁰ |
| <i>efa1/lifA</i> | Fator de aderência de EHEC (<i>EHEC factor for adherence</i>)/ <i>lymphocyte inhibitory factor A</i> | 38/126 (30,1) | SCALETSKY et al ⁶⁸ |
| | | 17/57 (28,8) | AFSET et al ⁷⁰ |
| <i>afa</i> | Adesina afimbrial (<i>afimbrial adhesins</i>) | 9/126 (7,1) | SCALETSKY et al ⁶⁸ |
| <i>ipf</i> | Fímbria LPF (<i>long polar fimbriae</i>) | 34/126 (27,0) | |
| <i>paa</i> | Proteína suína associada à lesão A/E (<i>porcine attaching and effacing lesion-associated protein</i>) | 24/126 (19,0) | |
| | | 23/57 (40,4) | AFSET et al ⁷⁰ |
| <i>sen</i> ou <i>set</i> | Enterotoxina similar a ShET de <i>Shigella flexneri</i> (<i>ShET enterotoxin</i>) | 28/126 (22,2) | SCALETSKY et al ⁶⁸ |
| | | 23/57 (40,4) | AFSET et al ⁷⁰ |
| <i>astA</i> ou <i>east-1</i> | Toxina termoestável (<i>enteroaggregative heat-stable toxin – EAST-1</i>) | 42/126 (33,3) | SCALETSKY et al ⁶⁸ |
| | | 29/99 (29,3) | GOMES et al ⁶⁹ |
| | | 8/57 (14,0) | AFSET et al ⁷⁰ |
| | | 29/65 (44,6) | DULGUER et al ⁷¹ |
| <i>per</i> | Regulador codificado por plasmídeo (<i>plasmid-encoded regulator</i>) | 33/65 (50,7) | |
| LEE A-D | Sequências A-D que fazem parte de LEE (<i>locus of enterocyte effacement</i>) | 65/65 (100,0) | |
| <i>tir</i> | Receptor de intimina | 64/65 (98,4) | |
| <i>shf</i> | Fator de virulência similar a <i>Shigella flexneri</i> | 2/57 (3,5) | AFSET et al ⁷⁰ |
| <i>pet</i> | Enterotoxina codificada por plasmídeo (<i>plasmid encoding toxin</i>) | 1/57 (1,8) | |
| <i>cdt</i> | Toxina citolética distendida (<i>cytotoxic distending toxin</i>) | 2/126 (1,6) | SCALETSKY et al ⁶⁸ |

* Número de amostras positivas / número de amostras pesquisadas; ** Percentual de amostras positivas.

Quadro 3 – Fatores de virulência observados em EPEC atípicas

De acordo com o quadro 3, observa-se que os genes da região LEEA-D que codificam o sistema de secreção do tipo III, as proteínas secretadas por este sistema (Esp) e a intimina (*eae*-EPEC *attaching and effacing*), e o gene *tir* que codifica o receptor de intimina, ambos participantes da lesão A/E, foram os genes identificados em EPEC-a com as maiores frequências, 100% e 98,4%, respectivamente. Os demais fatores de virulência observados em EPEC-a são as proteínas efetoras não codificadas pelo LEE- (*non* LEE-*nle*), *nle* C (87,7%) e F (70,2%), seguido de *nle*-B e E (ambas com variação de frequência entre 36,5% a 40,4%) e o gene *per* (regulador de LEE localizado em um plasmídeo) com 50%. As frequências aproximadas de 40% a 20% foram observadas para os fatores *hly*, *irp2*, *efa/lifA*, *ipf*, *paa* e *sen*. Frequências abaixo de 20% foram observadas para os demais fatores de virulência (*ehxA*, *afa*, *shf*, *pet* e *cdt*). Especificamente para enterotoxina EAST-1, codificada pelo gene *astA* e pesquisada por vários autores, os percentuais variaram de 14% a 44,6%. Todos esses fatores não relacionados à lesão A/E de EPEC (*hly*, *irp2*, *efa/lifA*, *ipf*, *paa*, *sen*, *ehxA*, *afa*, *shf*, *pet* e *cdt*) são frequentemente encontrados em outras categorias patogênicas como *E. coli* uropatogênica (UPEC), EHEC, EAEC, DAEC, além das EPEC.

De acordo com a revisão bibliográfica, podem-se identificar quatro técnicas laboratoriais utilizadas para o

diagnóstico e caracterização de EPEC: a sorotipagem, o teste de adesão em cultura de células, o FAS e as técnicas de biologia molecular. Entre estas técnicas, as únicas utilizadas para diferenciação entre EPEC-t e EPEC-a, são as técnicas de biologia molecular como a PCR convencional, PCR multiplex e PCR em tempo real (Quadro 4). Estas técnicas laboratoriais abrangem metodologias voltadas para aspectos específicos da EPEC como a identificação de antígenos (sorotipagem) e genes codificantes de fatores de virulência (PCR e suas variações), bem como, aspectos voltados à investigação da interação da bactéria com as células, como a formação da lesão A/E e condensamento de actina constatados no teste de FAS e a observação e classificação do tipo de adesão que as EPEC promovem em cultura de células.

A identificação e a diferenciação entre EPEC-t e EPEC-a compreendem, principalmente, critérios moleculares como a pesquisa dos genes *eae*, *stx*, *bfp* e a sequência EAF, sendo o perfil *eae+stx-EAF+bfp+* identificado para EPEC-t e o perfil *eae+stx-EAF-bfp-/+* para EPEC-a. Aspectos importantes que contribuem para melhor caracterização de EPEC-t e EPEC-a são: a observação da formação da lesão A/E que é encontrada nestas duas subcategorias; a expressão de BFP, o tipo de aderência promovido em cultura de células, sendo o padrão único de AL encontrado nas EPEC-t; e padrões variados encontrados entre as EPEC-a (Quadro 5).

| Técnica laboratorial | Diferenciação entre EPEC-t e EPEC-a | Descrição | Referências |
|--|-------------------------------------|---|---|
| Sorotipagem | Não | Identificação de antígenos somáticos, flagelares e capsulares | LLUQUE et al ⁷² ; GILLESPIE ⁷³ ; OPLUSTIL et al ²³ ; FRANCO ²⁴ |
| FAS (<i>fluorescent actin staining</i>) | Não | Deteção do condensamento de actina identificado durante a formação da lesão A/E | LLUQUE et al ⁷² ; VIDAL et al ¹⁹ ; MOREIRA et al ⁷⁴ ; PAIVA ⁷⁵ |
| Aderência em culturas de células | Não | Observação e classificação do tipo de aderência | LLUQUE et al ⁷² ; VIDAL et al ¹⁹ ; HERNANDES et al ²⁰ ; BUERIS ⁷⁶ ; FINLAY et al ⁷⁷ ; NATARO et al ⁷⁸ ; PAIVA ⁷⁵ ; PEDROSO et al ⁷⁹ ; SCALETSKY et al ⁸⁰ ; JAFARI et al ⁵⁵ |
| Biologia molecular (PCR convencional, PCR multiplex e PCR em tempo real) | Sim | Identificação de genes codificantes de fatores de virulência | LLUQUE et al ⁷² ; ABE et al ⁸¹ ; GILLESPIE ⁷³ ; ANDRADE ⁸² ; KIMATA et al ⁸³ ; LÓPEZ-SAUCEDO et al ⁸⁴ ; TOMA et al ⁸⁵ ; COSTA et al ⁶⁰ ; ARANDA et al ⁸⁶ ; SOUSA ⁶¹ ; BOUZARI et al ⁸⁷ ; NOVAIS e ALVES ⁸⁸ ; PAIVA ⁷⁵ ; JAFARI et al ⁵⁵ |

Quadro 4 – Técnicas para identificação e diferenciação de EPEC típica e atípica

| Característica | EPEC-t | EPEC-a |
|---|--------|-------------------|
| Gene <i>eae</i> (<i>E. coli</i> attachment-effacement) | + | + |
| Genes <i>stx</i> (<i>Shiga</i> toxin) | - | - |
| Sequência EAF (EPEC adherence factor) | + | - |
| Gene <i>bfpA</i> (<i>bundle-forming pilus</i>) | + | -/+* |
| Formação da lesão A/E (<i>attaching and effacing</i>) | + | + |
| Expressão de BFP (<i>bundle-forming pilus</i>) | + | - |
| Aderência padrão** | AL | LAL/DA/AA/AL***NA |

Fonte: Hernandez et al²⁰ com modificações.

+ : Presença; - : Ausência; * Sequência do *bfp* incompleta (Bortolini et al⁸⁹); ** Aderência padrão em células HeLa/HEp-2 - LA: aderência localizada; LAL: LA like; DA: aderente difusa; AA: aderência agregativa; NA: não aderente; *** Aderência localizada na EPEC-a é independente do *bfp*.

Quadro 5 – Características importantes de EPEC-t e EPEC-a que auxiliam na identificação laboratorial

DISCUSSÃO

A EPEC é uma das principais causadoras de enteroinfecções em crianças e adultos e, nas últimas décadas, estudos sobre esta categoria apontam que esse patógeno está cada vez mais presente na vida de diversas populações, interagindo e se adaptando ao ambiente, ao ponto de serem classificadas em duas subcategorias distintas: EPEC-t e EPEC-a^{43,48,53,68}.

As EPEC-t estiveram por longo tempo associadas à diarreia infantil, no entanto, o atual cenário etiológico demonstra redução na prevalência desta subcategoria em detrimento do aumento dos isolamentos de EPEC-a em casos de diarreia^{15,16,17}, inclusive como única categoria de *E. coli* diarréiogênica associada à diarreia⁹⁰. Além deste fato, constatou-se que recentes surtos ocorridos em humanos em diferentes localidades foram ocasionados por EPEC-a^{51,53,58,62,63}.

Além dos seres humanos, as EPEC podem ser identificadas em uma diversidade de animais e ambientes naturais, porém este comportamento epidemiológico pode ser diferenciado dependendo da subcategoria de EPEC. Segundo Oh et al^{41,42}, Tóth et al³⁵, Ibenyassine et al⁴⁶ e Chandran e Mazumder⁴³, as EPEC-a são identificadas com frequência em águas de rios, enseadas, lagoas e regiões portuárias, além de estarem presentes em animais domésticos e silvestres. Os mesmos estudos apontam a presença das EPEC-t nos mesmos ambientes relatados acima, porém, sua ocorrência entre os animais é rara, tendo sido identificadas apenas em animais silvestres criados em cativeiro, como o macaco³⁷, coiotes e cães de uma área de bacia hidrográfica no Canadá⁴³. Estes dados apontam para uma diferença comportamental entre as duas subcategorias que, provavelmente, influenciam o modo de transmissão para o ser humano.

Os artigos de revisão de Hernandez et al²⁰ e Sousa⁹¹, ressaltam o alto índice de isolados de EPEC-a em animais domésticos e silvestres, embora não haja evidência de transmissão direta de animais para seres humanos, algumas estirpes de EPEC-a isoladas de animais pertencem aos sorogrupos implicados em doenças humanas, por exemplo O26, O103, O119, O128 e O142.

Ao longo de muitos anos, o homem tem mantido um estreito contato com os animais, porém esta convivência tem se intensificado, principalmente em relação aos animais domésticos e, apesar de cães e gatos terem sido animais de companhia por milhares de anos, nos dias atuais desempenham um importante papel para a sociedade humana³². O problema dessa convivência é que tanto os animais domésticos quanto os seus donos tornam-se possíveis reservatórios de doenças como gastroenterite humana³³. Um importante achado epidemiológico sobre as EPEC-a é a presença delas em animais domésticos saudáveis ou

diarréicos^{2,31}, aumentando as chances de transmissão para humanos, mas mesmo com sua ampla distribuição e sua comprovada participação como causa de diarreia humana, sua via de transmissão não está claramente estabelecida²⁰.

Em contraste com a epidemiologia das EPEC-a, Hernandez et al²⁰ e Sousa⁹¹ descrevem o ser humano como principal reservatório de EPEC-t, sendo raramente identificada entre os animais. Esta observação está de acordo com outros estudos que consideram os seres humanos como único reservatório de EPEC-t, com exceção de alguns relatos de amostras isoladas de cães⁴⁴ e macacos³⁷.

Estudos epidemiológicos que demonstram a frequência destes patógenos em diferentes animais e no ambiente são importantes para revelar que as EPEC-a, assim como a EHEC (categoria zoonótica de *E. coli*), podem ser observadas em diferentes hospedeiros animais e indicam que eles podem ser um reservatório destes patógenos com potencial para contaminar as águas superficiais e impactar na saúde humana⁴³. No caso específico de EPEC-a, esse impacto vai depender do perfil de virulência apresentado pela bactéria. Como também demonstrado por Chandran e Mazumder⁴³, a maioria das amostras de EPEC isoladas de animais foram de EPEC-a (60/593: 10,11%), comparado ao número inferior de EPEC-t (8/593: 1,3%) isoladas apenas de coiotes (sete isolados) e cães (um isolado).

Gomes et al⁶⁹, ao avaliarem 17 sequências gênicas relacionadas a fatores de virulência em EPEC-a (*eae*+EAF-), identificaram 34 diferentes perfis de virulência sendo os mais frequentes: *eae* (31,3% – 31/99), *eae hly astA pet irp2* (8,1% – 8/99), *eae hly* (6,1% – 6/99), *eae shf* (5,1% – 5/99), *eae irp2* (5,1% – 5/99), *eae perA bfpA astA* (4% – 4/99), *eae perA bfpA* (4% – 4/99). Além destes fatores de virulência citados por Gomes et al⁶⁹, Dulguer et al⁷¹, incluindo em sua pesquisa os fatores de virulência comuns em EPEC (lesão A/E), como a região LEE (A-D), o receptor de intimina (*Tir*) e o gene regulador plasmidial (*per*), identificaram os perfis de virulência: LEEA-D *tir* (43% – 28/65), *perA* LEEA-D *tir astA* (33,8% – 22/65), *perA* LEEA-D *tir* (13,8% – 9/65) como os mais frequentes, observando que, com exceção da toxina AST, os demais fatores de virulência pesquisados estiveram ausentes (*hly*, *pet*, *afa*, *ehxA*, *agg-A*). Estes dados indicam, com exceção dos fatores de virulência comuns à lesão A/E, que ocorre variação e flexibilidade dos fatores de virulência acessórios presentes em EPEC-a.

Apesar do gene *astA* (enterotoxina EAST-1) ser detectado com frequência em EPEC-a (Quadro 3) quando comparada à EPEC-t⁷¹ e dos surtos de diarreia relacionados à EPEC-a produtora de EAST-1 (gene *astA*), Yatsuyangi et al⁹² e Afset et al⁷⁰ observaram associação negativa deste gene (*astA*) e de outros fatores de virulência (*yjaA*, *ibeA* e *b1121*) com EPEC-a isoladas de casos diarréicos. De acordo com Scaletsky

et al⁶⁸, foram identificados dois marcadores de virulência, os genes para toxina *ehxA* e a adesina *paa*, que poderão ser úteis na detecção de EPEC-a e que foram associados positivamente com EPEC-a isoladas de crianças com diarreia⁷⁰.

Além de *ehxA* e *paa*, os genes localizados na ilha de patogenicidade OI-122 (*efa1/lifA*, *nleB*, *nleE*, *set/ent*) quando tiveram suas frequências comparadas entre EPEC-a proveniente de casos com e sem diarreia, foram associados significativamente às amostras de EPEC-a isoladas de casos diarreicos⁷⁰. De acordo com Vieira et al⁹³, a presença de ilha de patogenicidade (PAI) OI122 e a ocorrência simultânea dos genes *efa1/lifA*, *sen*, *nleB* e *nleE* foram estatisticamente associadas à EPEC-a isoladas de casos diarreicos, sugerindo que a detecção completa da PAI OI122 poderia auxiliar na identificação de potenciais estirpes patogênicas de EPEC-a. Enquanto que a presença de PAI OI122 é complementar à patogênese de EPEC-a, as EPEC-a que apresentam o locus LEE completo (A-D) possuem potencial patogênico⁷¹, o que foi confirmado por Trabulsi et al¹⁴ ao observarem que 75% das EPEC-a LEEA-D+ apresentam potencial para promover a lesão A/E observado pelo teste de FAS positivo.

Entre as EPEC com perfil de virulência (*eae*+EAF–*stx*–) classificadas como EPEC-a, Trabulsi et al¹⁴ identificaram que a maioria (80% – 72/90) apresentou AL ou suas variações como: a aderência localizada *like* (LAL) e a aderência localizada após 6 h de ensaio (LA6). No entanto, outros tipos de aderência como a aderência agregativa (AA) e aderência difusa (AD) e a combinação de AL com AA ou AD também foram observadas. Isto indica que o teste de adesão em cultura de células não tem poder discriminatório para diferenciação entre EPEC-t e EPEC-a. O mesmo deve ser utilizado para complementar os estudos de patogenicidade para esta subcategoria.

De acordo com Elias et al⁹⁴, ao avaliarem a detecção de marcadores de virulência entre 34 *E. coli* pertencentes aos sorogrupos de EPEC apresentando o fenótipo AA, observaram que apenas duas amostras foram positivas para o gene *eae*, nas quais os demais marcadores pesquisados foram negativos (*bfp*, *aggR*, *aaf*, *shf*, *astA* e *irp*). Os marcadores mais frequentes entre as amostras *eae* negativas foram: *aggR* (35,3%), *shf* (55,9%), *astA* (64,7%) e *irp* (70,6%), característicos de EAEC, sugerindo que apesar das amostras de EPEC-a compartilharem diversos genes de virulência entre as outras categorias patogênicas, incluindo estes fatores frequentes entre EAEC, quando as *E. coli* apresentaram adesão AA, existiu baixa probabilidade das mesmas serem EPEC-a, contudo a adesão AA não excluiu uma *E. coli* de ser EPEC-a.

Um estudo com EPEC-a (*eae*+EAF–*stx*–) isoladas de pacientes com diarreia sanguinolenta, utilizando o MLST (*multilocus sequence typing*), os perfis de virulência e a sorotipagem, identificou estas

amostras como EHEC que perderam o gene *stx* durante a infecção⁹⁵. Este evento é conhecido como interconversão de *E. coli* A/E, ocasionado pelo ganho ou perda de genes por transferência horizontal ou por meio de elementos genéticos móveis, tornando mais complicada a caracterização das diferentes categorias de *E. coli* diarreio gênica, principalmente entre as produtoras de lesão A/E que apresentam o gene *eae*+, como a EPEC e a STEC/EHEC⁹⁶. Este evento pode influenciar os aspectos epidemiológicos de EPEC-a e justificar a capacidade de adquirir, manter e expressar genes de virulência codificados por outras categorias de *E. coli* diarreio gênicas⁹⁷.

Nesta revisão foram identificadas quatro técnicas capazes de identificar *E. coli* enteropatogênica: a sorotipagem, o teste de adesão em cultura de células, o FAS (*fluorescent actin staining*) e as técnicas de biologia molecular^{55,72,73,74,75,80}. De acordo com Lluque et al⁷², são utilizados dois métodos principais: a sorotipagem e a PCR, sendo apenas esta última com potencial para identificação de EPEC. Atualmente a sorotipagem é uma técnica utilizada especificamente para detecção apenas de antígenos somáticos e flagelares, sendo inapropriada para identificação de EPEC e diferenciação das suas subcategorias, pois um mesmo sorogrupo ou sorotipo pode ser EPEC-t ou EPEC-a. Entretanto, essa técnica tem uma importância epidemiológica para descrição dos sorotipos por reservatórios ou regiões geográficas, além de permitir a classificação da EPEC-a em dois subgrupos: sorotipos clássicos, associados com diarreia e as que não são típicas pertencentes aos sorotipos não clássicos^{23,24,68,73}.

O diagnóstico molecular é capaz de identificar EPEC e diferenciar EPEC-t de EPEC-a e os genes alvos utilizados neste diagnóstico são: *eae*, que está presente nas duas subcategorias de EPEC; o gene *bfp*, presente apenas na EPEC-t; e os genes *stx*, que são ausentes entre as EPEC, pois são específicos de EHEC/STEC (*E. coli* enterohemorrágica)²⁰. Para identificação de EPEC-a é mais comum o perfil EAF–e *bfp*–, porém, algumas EPEC-a podem apresentar o gene *bfp* (EAF– e *bfp*+), isso acontece devido à existência de um plasmídeo EAF defeutivo não detectado pela PCR, o que leva, na maioria das vezes, à ausência de expressão da fímbria BFP detectada molecularmente⁸¹.

De acordo com Trabulsi et al¹⁴, das 99 amostras EPEC consideradas atípicas (*eae*+EAF–*stx*–) e testadas para o gene *bfp*, 14,1% (14/99) foram positivas, no entanto apenas duas destas expressaram a fímbria BFP e carregavam o gene *perA*, significando que as EPEC-a podem expressar gene *bfp* mesmo com ausência do plasmídeo EAF, porém não apresentam AL em 3 h de ensaio, como observado em EPEC típicas. Baseando-se nesta informação, as EPEC-a podem expressar fímbria BFP, porém sem apresentar AL, ou podem apresentar AL que independe da presença da fímbria BFP. As observações de Trabulsi et al¹⁴, de que alguns sorotipos como O142:H6, O119:H2 e O128:H2 apresentam

bfp com EAF defectivo (EAF⁻), sugerem que a melhor característica para distinção de EPEC-t e EPEC-a seria a produção ou não da fímbria BFP, respectivamente, todavia a expressão desta fímbria pode não estar associada ao padrão de adesão localizada característico de EPEC-t.

Após extensas análises genotípicas e fenotípicas, Vieira et al⁹⁸ concluíram que amostras de EPEC-a (*eae*+EAF⁻*stx*⁻) de sorogrupos não clássicos compreendem um grupo heterogêneo composto por EPEC-a, EAEC, DAEC e UPEC que adquiriram o locus LEE por transferência horizontal, ou representam EPEC-t que perderam o plasmídeo EAF (ou parte dele), EHEC/STEC que perderam o *stx*, ou *E. coli* da microbiota normal que adquiriram o locus LEE. Estes achados demonstram os questionamentos para esta subcategoria e evidenciam a versatilidade deste patotipo, que apesar das inúmeras pesquisas ainda necessita de esclarecimentos.

CONCLUSÃO

A EPEC é reconhecida como uma das principais causas da diarreia desde 1940 e, até o momento, continua associada a casos esporádicos e surtos de diarreia infantil, porém apresentando distintos perfis de virulência que permitem classificá-las em duas subcategorias (EPEC-t e EPEC-a) que apresentam comportamento epidemiológico distinto.

As EPEC-t e EPEC-a podem ser encontradas entre humanos, animais e no ambiente, entretanto com algumas diferenças. As EPEC-a são frequentemente encontradas entre humanos e em uma variedade de hospedeiros animais, indicando que os mesmos podem

servir de reservatórios e de fontes de contaminação para o homem e o ambiente. As EPEC-t têm como principal reservatório os seres humanos, no entanto já foram registradas raras ocorrências em alguns animais, como macaco, coioite e cachorro.

Os fatores de virulência mais frequentes em EPEC-a são os codificados por genes que participam da lesão A/E localizados na região LEE (A-D) que codificam o sistema de secreção do tipo III, as proteínas secretadas por este sistema (Esp) e a intimina (*eae*) e o receptor de intimina (*tir*), além das proteínas efetoras não codificadas por LEE (*nle*). A presença da região LEE completa (LEE A-D) e da ilha de patogenicidade O1-122 (*efa1/lifA*, *nleB*, *nleE*, *set/ent*), juntamente com os genes da hemolisina (*ehxA*) e adesina (*paa*), podem auxiliar na identificação de potenciais estirpes patogênicas de EPEC-a.

As EPEC-a apresentam inúmeros fatores de virulência comuns e específicos de outras categorias patogênicas como UPEC, EHEC, EAEC e DAEC. Esse fenômeno conhecido como interconversão pode ser responsável pelo aumento da frequência epidemiológica de EPEC-a e justificar a habilidade das EPEC-a em expressar diferentes perfis de virulência.

A identificação conclusiva de EPEC é realizada pelo diagnóstico molecular, onde se pesquisam os genes *eae*, EAF e *stx*, sendo o perfil *eae*+EAF+*stx*⁻ de EPEC-t e o *eae*+EAF⁻*stx*⁻ de EPEC-a. A investigação da presença do gene *bfp* e a expressão desta fímbria são importantes para esclarecer a patogênese de EPEC-a e melhor definir estes critérios moleculares utilizados para classificação das duas subcategorias de EPEC.



Enteropathogenic *Escherichia coli*: a versatile diarrheagenic category

ABSTRACT

Escherichia coli (EPEC) was the first category of *E. coli* to be discovered and continues to be associated with sporadic cases and outbreaks of diarrhea in children. In 1995 it was classified as typical and atypical EPEC and, until the current moment, much has been studied about the differences of these two pathogenic and epidemiological subcategories and their similarity to other pathotypes. To better know these studies and consolidate this information, this literature evaluated 98 bibliographic sources, with 81 articles, eight theses, four dissertations and five books. This research highlighted the following findings and conclusions: the atypical EPEC (a-EPEC) are present in humans and a variety of animal hosts, suggesting that they may serve as a reservoir and source of infection for humans and the environment; typical EPEC (t-EPEC) has humans as the main reservoir, however, they have been recorded in some rare occurrences wildlife; a-EPEC have several common virulence factors and specific categories of other pathogens, suggesting that increased prevalence of EPEC is related to interconversion, the presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) complete region (LEE A-D) and pathogenicity island HI-122 (*efa1/lifA*, *nleB*, *nleE*, *set/ent*) with the hemolysin gene (*ehxA*) and the toxin (*paa*) can help in identification of potentially pathogenic a-EPEC, but the conclusive identification of EPEC is performed by molecular diagnosis, which identifies genes *eae*, EAF and *stx*, and the profile *eae*+EAF+*stx*⁻ of t-EPEC and *eae*+EAF⁻*stx*⁻ in a-EPEC.

Keywords: Enteropathogenic *Escherichia coli*; Epidemiology; Virulence Factors.

Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreogênica versátil

RESUMEN

El *Escherichia coli* enteropatogênico (EPEC) fue la primera categoría de *E. coli* reconocida como diarreogênica, siendo además asociada a casos esporádicos y brotes de diarrea infantil. En 1995, la EPEC fue clasificada en típica y atípica y, hasta este momento, mucho se ha investigado sobre las diferencias patógenas y epidemiológicas de estas dos subcategorías y su semejanza con otras categorías. Para consolidar estas informaciones, la presente investigación evaluó 98 fuentes bibliográficas, siendo 81 artículos, ocho tesis, cuatro disertaciones y cinco libros. Esta investigación destacó los siguientes resultados y conclusiones: las EPEC típicas (EPEC-t) tienen como principal reservorio a los seres humanos, sin embargo se han registrado raras ocurrencias en algunos animales silvestres; las EPEC atípicas (EPEC-a) se encuentran entre humanos y una variedad de otros huéspedes animales que pueden servir de reservorio y de fuente de contaminación para el hombre y el ambiente, además, las EPEC-a presentan innumerables factores de virulencia comunes y específicos de otras categorías patógenas, lo que sugiere que el aumento de su prevalencia esté relacionado al fenómeno de interconversión; la presencia de la región LEE (*locus of enterocyte effacement*) completa (LEEAD) y de la isla de patogenicidad OI-122 (*efa1/lifA, nleB, nleE, set/ent*), junto a los genes de la hemolisina (*ehxA*) y la adhesina (*paa*) pueden auxiliar en la identificación de potenciales estirpes patógenas de EPEC-a; la identificación conclusiva de EPEC se realiza por el diagnóstico molecular, en el cual se investigan los genes *eae*, *EAF* y *stx*, siendo el perfil *eae*+*EAF*+*stx*- de EPEC-t y el *eae*+*EAF*-*stx*- de EPEC-a.

Palabras clave: *Escherichia coli* enteropatogênica; Epidemiología; Factores de Virulencia.



REFERÊNCIAS

- 1 Winn WJ, Alves S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schrecherberger P, et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 208-25.
- 2 Morato EP, Leomil L, Beutin L, Krause G, Moura RA, Castro PAF. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. *Zoonoses Public Health*. 2009 Jun;56(5):229-37.
- 3 Moura RA. Estudo das relações clonais entre amostras de *Escherichia coli* atípica de origem animal e humana [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2009. 152 p.
- 4 Ayala CO. Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica EPEC e *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2009. 62 p.
- 5 Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. São Paulo: Varela; 2010.
- 6 Martinez MB, Trabulsi LR. Enterobacteriaceae. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editores. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2008. p. 271-9.
- 7 Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jan;11(1):142-201.
- 8 Teng LJ, Hsueh PR, Liaw SJ, Ho SW, Tsai JC. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004 Dec;37(6):327-34.
- 9 Nguyen TV, Le VP, Le HC, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol*. 2005 Feb;43(2):755-60.
- 10 Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, Neogi PK, Ansaruzzaman M, Bhuiyan, et al. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol*. 1995 Apr;33(4):973-7.
- 11 Albert MJ. Epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in Bangladesh. *Rev Microbiol*. 1996;27(1):17-20.
- 12 Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. *Sao Paulo Med J*. 2000 Jan;118(1):21-9.
- 13 Angeles GR. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex*. 2002 sep;44(5):464-75.
- 14 Trabulsi LR, Keller R, Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2002 May;8(5):508-13.
- 15 Souza EC, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gilio AE, Racz ML, et al. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *Rev Pediatr*. 2002 jan-fev;78(1):31-8.

- 16 Ghosh PK, Ali A. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Delhi and the National Capital Region, India. *J Med Microbiol*. 2010 Oct;59(Pt 10):1156-62.
- 17 Moreno ACR, Fernandes Filho A, Gomes TAT, Ramos STS, Montemor LPG, Tavares VC, et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Jan;66(1):50-7.
- 18 Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr Opin Infect Dis*. 2011 Oct;24(5):478-3.
- 19 Vidal JE, Canizález RA, Gutiérrez J, Navarro F. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex*. 2007 Sep-Oct;49(5):376-86.
- 20 Hernandez RT, Waldir PE, Vieira MAM, Gomes AT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Aug;297(2):137-49.
- 21 Dean P, Maresca M, Kenny B. EPEC's weapon of mass subversion. *Curr Opin Microbiol*. 2005 Feb;8(1):28-34.
- 22 Rocha LB. Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto Butantan; 2012. 86 p.
- 23 Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3. ed. São Paulo: Sarvier; 2010. 402 p.
- 24 Franco RM. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana [tese]. Niterói (RJ). Universidade Federal Fluminense; 2002. 153 p.
- 25 Silva ZN, Cunha A, Lins MC, Carneiro LA, Almeida ACF, Queiroz MLP. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2001 Aug;35(4):375-9.
- 26 Bernardi E, Armas RD, Caldeira MF, Ribeiro GA. Caracterização microbiológica e sorológica de linhagens de *Escherichia coli*, isoladas de carne moída comercializada em Pelotas, RS. *Hig Aliment*. 2004 out;18(125):82-6.
- 27 Martins AGLA, Nascimento AR, Mouchrek Filho JE, Mendes Filho NE, Souza AG, Aragão NE, et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. *Cienc Rural*. 2010 ago;40(8):1791-6.
- 28 Gómez-Aldapa CA, Torres-Vitela MR, Acevedo-Sandoval OA, Rangel-Vargas E, Villarruel-López A, Castro-Rosas A. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteroinvasive *E. coli*, enteropathogenic *E. coli*, and enterotoxigenic *E. coli* on tomatoes from public markets in Mexico. *J Food Prot*. 2013 Sep;76(9):1621-5.
- 29 Canizalez-Roman A, Gonzalez-Nuñez E, Vidal JE, Flores-Villaseñor H, León-Sicairos N. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *Int J Food Microbiol*. 2013 Jun;164(1):36-45.
- 30 Otero V, Rodríguez-Calleja JM, Otero A, García-López ML, Santos JA. Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Oct;79(19):5864-9.
- 31 Sydow ACMV, Coogan DG, Moreno JA, Melville AM, Benites NR. Ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. *Arq Inst Biol*. 2006 out-dez;73(4):401-7.
- 32 Caliman MCW. Estudo de vigilância bacteriológica: isolamento, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos domésticos na região de Ribeirão Preto [dissertação]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2010. 113 p.
- 33 Pereira CS, Barros PR, Silva PM, Rodrigues DP. Patógenos isolados do trato gastrointestinal de cães saudáveis no Rio de Janeiro. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009 Aug;61(4):1000-1.
- 34 Verdier K, Nyman A, Greko C, Bengtsson B. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Acta Vet Scand*. 2012 Jan;54(2):1-10.
- 35 Tóth I, Schmidt H, Kardos G, Lancz S, Creuzburg K, Damjanova I, et al. Virulence genes and molecular typing of different groups of *Escherichia coli* O157 strains in cattle. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Oct;75(19):6282-91.
- 36 Knöbl T, Godoy SN, Matushima ER, Guimarães MB, Ferreira AJP. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2008;45 Supl.:54-60.
- 37 Carvalho MV, Giles LC, Ziebell K, Ribeiro AM, Catão-Dias JL, Sinhorini LI, et al. *J Clin Microbiol*. 2003 Mar;41(3):1225-34.
- 38 Förster M, Klimpel S, Mehlhorn H, Sievert K, Messler S, Pfeffer K. Pilot study on synanthropic flies (*E. G. Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. *Parasitol Res*. 2007 Jun;101(1):243-6.

- 39 Cookson AL, Cao M, Bennett J, Nicol C, Thomson-Carter F, Attwood GT. Relationship between virulence gene profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* isolates from cattle and sheep in New Zealand. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Jun;76(11):3744-7.
- 40 Fröhlicher E, Krause G, Zweifel C, Beutin L, Stephan R. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiol.* 2008 Sep;8(144):1-6.
- 41 Oh JY, Kang MS, Hwang HT, An BK, Kwon JH, Kwon YK. Epidemiological investigation of *eaeA*-positive *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* strains isolated from healthy wild birds. *J Microbiol.* 2011 Oct;49(5):747-52.
- 42 Oh JY, Kang MS, An BK, Shin EG, Kim MJ, Kim YJ, et al. Prevalence and characteristics of intimin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy chickens in Korea. *Poult Sci.* 2012 Oct;91(10):2438-43.
- 43 Chandran A, Mazumder A. Prevalence of diarrhea-associated virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various animals hosts. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Dec;79(23):7371-80.
- 44 Beaudry M, Zhu C, Fairbrother JM, Harel J. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan;34(1):144-8.
- 45 Monaghan A, Byrne B, Fanning S, Sweeney T, McDowell D, Bolton DJ. Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. *J Appl Microbiol.* 2013 Feb;114(2):595-603.
- 46 Ibenyassine K, AitMhand R, Karamoko Y, Cohen N, Ennaji MM. Use of repetitive DNA sequences to determine the persistence of enteropathogenic *Escherichia coli* in vegetables and in soil grown in fields treated with contaminated irrigation water. *Lett Appl Microbiol.* 2006 Nov;43(5):528-33.
- 47 Sidhu JP, Ahmed, W, Hodgers L, Toze S. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jan;79(1):328-35.
- 48 Albertini LS. Ecologia, fatores associados à virulência e diversidade de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água de lastro, água de regiões portuárias e moluscos bivalves no Brasil [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2009. 215 p.
- 49 Melo SK. Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de lagoas do Parque Estadual Rio Doce, Minas Gerais [dissertação]. Ouro Preto (MG): Universidade Federal de Ouro Preto; 2006. 100 p.
- 50 Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med Biol Res.* 2006 Apr;39(4):507-1.
- 51 Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Nov;102(7):839-44.
- 52 Oliva CAG, Scaletsky I, Morais MB, Fagundes Neto U. Diarréia aguda grave associada à *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. *Rev Assoc Med Bras.* 1997 out-dez;43(4):284-9.
- 53 Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. *J Med Microbiol.* 2004 Nov;53(Pt 11):1137-44.
- 54 Robins-Browne RM, Bordun AM, Tauschek M, Bennett-Wood VR, Russell J, Oppedisano F, et al. *Escherichia coli* and community acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2004 Oct;10(10):1797-805.
- 55 Jafari A, Aslani MM, Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iran J Microbiol.* 2012 Sep;4(3):102-17.
- 56 Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KRS, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CMF, et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 2007 Oct;45(10):3396-9.
- 57 Bendezú RYA, Huasasquiche JGL. Serotipificación de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en cuadros diarréicos agudos de niños menores de cinco años: Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, noviembre 2000-marzo 2001 [tese]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
- 58 Afset JE, Bergh KR, Bevanger L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol.* 2003 Nov;52(11):1015-9.
- 59 Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, et al. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (μ B and ξ R/ β 2B). *J Med Microbiol.* 2006 Sep;55(9):1165-74.

- 60 Costa ARF, Lima KVB, Souza CO, Loureiro ECB. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010 jun;1(2):77-84.
- 61 Sousa EB. Aspectos microbiológicos e epidemiológicos da doença diarreica aguda no município de Juruti, Pará [dissertação]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas; 2010. 78 p.
- 62 Shetty VA, Kumar SH, Shetty AK, Karunasagar I, Karunasagar I. Prevalence and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adults and children in Mangalore, India. *J Lab Physicians*. 2012 Jan-Jun;4(1):24-9.
- 63 Hannaoui E, Villalobos L, Martínez R, Maldonado A, Hagel I, Bastardo J. Diarrheagenic *Escherichia coli* associated with acute diarrhea in children of Cumaná, Venezuela. *Invest Clin*. 2010 Dec;51(4):489-500.
- 64 Spano LC, Sadovsky AD, Segui PN, Saick KW, Kitaga SM, Pereira FE, et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. *J Med Microbiol*. 2008 Mar; 57(Pt 3):359-63.
- 65 Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Möllby R, Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. *J Med Microbiol*. 2009 May; 58(5):630-7.
- 66 Franzolin MR, Alves RC, Keller R, Gomes TA, Beutin L, Barreto ML, et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Jul;100(4):359-63.
- 67 Sakkejha H, Byrne L, Lawson AJ, Jenkins C. An update on the microbiology and epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* in England 2010-2012. *J Med Microbiol*. 2013 Oct; 62(10):1531-4.
- 68 Scaletsky ICA, Aranda KRS, Souza TB, Silva NP, Morais MB. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov; 47(11):3756-9.
- 69 Gomes TAT, Irino K, Girão DM, Girão VBC, Guth BEC, Vaz TMI, et al. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg Infect Dis*. 2004 Oct;10(10):1851-5.
- 70 Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, et al. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J Clin Microbiol*. 2006 Oct;44(10):3703-11.
- 71 Dulguer MV, Fabbriotti SH, Bando SY, Moreira-Filho CA, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. 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*. 2003 Dec;188(11):1685-94.
- 72 Lluque A, Mercado E, Riveros M, Alvarado L, Carlos E, Colichón ASE, et al. Comparación entre el diagnóstico serológico y el diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). *Rev Gastroenterol Peru*. 2010 abr-jun;30(2):121-5.
- 73 Gillespie SH. *Medical microbiology*. São Paulo: Premier; 2006. p. 252-4.
- 74 Moreira FC, Vieira MAM, Ferreira AJ, Girão DM, Vaz TM, Rosa AC, et al. *Escherichia coli* strains of serotype O51: H40 comprise typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains and are potentially diarrheagenic. *J Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1462-5.
- 75 Paiva FPT. Quorum sensing em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto Butantan; 2011. 30 p.
- 76 Bueris V. Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) que apresenta o padrão de adesão localizada-like com a célula epitelial *in vitro* [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2008. 131 p.
- 77 Finlay BB, Rosenshine I, Donnenberg MS, Kaper JB. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect Immun*. 1992 Jun;60(6):2541-3.
- 78 Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J*. 1987 Sep;6(9):829-31.
- 79 Pedroso MZ, Freymuller E, Trabulsi LR, Gomes TA. Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. *Infect Immun*. 1993 Mar;61(3):1152-6.
- 80 Scaletsky ICA, Pedroso MZ, Oliva CAG, Carvalho RLB, Morais MB, Fagundes-Neto UA. 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*. 1999 Jul;67(7):3410-5.
- 81 Abe CM, Trabulsi LR, Blanco J, Blanco M, Dahbi G, Blanco JE, et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*⁺ *EAF*-negative *stx*⁻ genetic profile. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Aug;64(4):357-65.

- 82 Andrade JRC. Invasion by EPEC. *Rev Microbiol.* 1996;27(1S):63-6.
- 83 Kimata K, Shima T, Shimizu M, Tanaka D, Isobe J, Gyobu Y, et al. Rapid characterization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Microbiol Immunol.* 2005 Jun;(6):485-92.
- 84 López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli* dispatches. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jan;9(1):127-31.
- 85 Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2669-71.
- 86 Aranda KRS, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Feb;267(2):145-50.
- 87 Bouzari S, Aslani MM, Oloomi M, Jafari A, Dashti A. Comparison of multiplex PCR with serogrouping and PCR-RFLP of *fliC* gene for the detection of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Braz J Infect Dis.* 2011 Jul-Aug;15(4):365-9.
- 88 Novais CM, Alves MP. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. *Rev Biotecnol Cienc Desenvol.* 2004 jul-dez;33:10-3.
- 89 Bortolini MR, Trabulsi LR, Keller R, Frankel G, Sperandio V. Lack of expression of bundle-forming pili in some clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is due to a conserved large deletion in the *bfp* operon. *FEMS Microbiol Lett.* 1999 Oct;179(1):169-74.
- 90 Ferrer SR. Fatores de risco das diarreias em crianças em Salvador, Bahia [tese]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2007. 385 p.
- 91 Sousa CP. *Escherichia coli* um patógeno bacteriano especializado. *Rev Biol Cienc Terra.* 2006;6(1): 341-52.
- 92 Yatsuyanagi J, Saito S, Miyajima Y, Amano K-I, Enomoto K. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):2033-9.
- 93 Vieira MAM, Salvador FA, Silva RS, Irino K, Vaz TMI, Rockstroh AC, et al. Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1452-5.
- 94 Elias WP, Barros SF, Moreira CG, Trabulsi LR, Gomes TAT. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains among classical enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroups. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3540-1.
- 95 Bielaszewska M, Middendorf B, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, Karch H. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in host-pathogen evolution. *Clin Infect Dis.* 2008 Jul;47(2):208-17.
- 96 Schmidt MA. LEE ways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol.* 2010 Nov;12(11):1544-52.
- 97 Abreu AG, Bueris V, Porangaba TM, Sircili MP, Navarro-Garcia F, Elias WP. Autotransporter rotein-encoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jan;79(1):411-4.
- 98 Vieira MAM, Andrade JRC, Trabulsi LR, Rosa ACP, Dias AMG, Ramos SRT, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and shiga toxin DNA probe sequences. *J Infect Dis.* 2001 Mar;183(5):762-72.

Recebido em / Received / Recibido en: 4/12/2015
 Aceito em / Accepted / Aceptado en: 6/4/2016