



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NICOLE RIBEIRO DE LIMA

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA TÍPICA E ATÍPICA EM AMOSTRAS
DE CARNE MOÍDA NA CIDADE DE LONDRINA, PR**

Londrina
2016

NICOLE RIBEIRO DE LIMA

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA TÍPICA E ATÍPICA EM AMOSTRAS
DE CARNE MOÍDA NA CIDADE DE LONDRINA, PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Jacinta Sanchez Pelayo.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Lima, Nicole Ribeiro .

PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA TÍPICA E ATÍPICA EM AMOSTRAS DE CARNE MOÍDA NA CIDADE DE LONDRINA, PR. / Nicole Ribeiro Lima. - Londrina, 2016.

42 f.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Carne moída - Tese. 2. EAEC - Tese. 3. Sorotipos - Tese. 4. Genes de virulência - Tese. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

NICOLE RIBEIRO DE LIMA

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA TÍPICA E ATÍPICA EM AMOSTRAS DE
CARNE MOÍDA NA CIDADE DE LONDRINA, PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez
Pelayo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de junho de 2016.

DEDICA

Por me ensinarem os valores da vida, da honestidade, humildade e do amor, dedico esse trabalho aos meus pais Érika e Reinaldo. Obrigada por serem exemplo de determinação e dedicação a nossa família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concedido os dons da sabedoria e da persistência. Por dar-me perseverança sempre. E pela saúde física, mental e espiritual.

Aos meus pais por todo apoio e encorajamento que me deram durante toda a vida e em especial nesse momento tão difícil e importante. Agradeço pelos esforços e sacrifícios que sempre fizeram por mim e por todo carinho e amor dedicado.

Aos meus irmãos pela amizade, companheirismo e encorajamento.

Ao meu namorado Marcel por todo amor, apoio, incentivo e principalmente paciência em todos os momentos.

À minha orientadora Dra. Jacinta Sanchez Pelayo, não só pela constante orientação neste trabalho, mas também pelos ensinamentos, atenção, amizade e dedicação ao longo deste período.

Ao Professor Dr. Sérgio P. Dejato da Rocha pelos auxílios prestados no decorrer deste trabalho.

Ao meu amigo Paulo, pela prestatividade, amizade e companheirismo nesses anos de laboratório.

À Claci por me ajudar durante todo o experimento no preparo de materiais, pela prestatividade nas inúmeras coletas realizadas, pelas caronas nos dias de sol ao TAM e pelas boas risadas durante todos esses anos.

À Tatiane e Angélica, pela amizade e auxílios com os experimentos deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, pela amizade, bate-papos e pela ajuda nos experimentos durante esses anos.

À Fundação Araucária pelo financiamento do projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu mais profundo e sincero: **Muito Obrigada.**

LIMA, Nicole Ribeiro. **Prevalência e caracterização de *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica em amostras de carne moída na cidade de Londrina, PR.** 2016. 42 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um patógeno emergente que pode causar diarreia aguda e persistente, em crianças e adultos. Surto de diarreia em vários países foram associados à EAEC pela ingestão de alimentos contaminados. Nos últimos anos, diagnóstico molecular para caracterizar EAEC típica (EAECt) utilizando os genes *aatA* e *aggR* e para EAEC atípica (EAECa) os genes *aaiC* e *aaiA*, vem sendo utilizado como alternativa ao teste de adesão. Assim, o presente estudo teve como objetivo pesquisar a prevalência de EAECt e EAECa em 100 amostras de carne moída bovina na cidade de Londrina, através do teste de adesão em células HEp-2 e da pesquisa dos genes *aatA*, *aggR*, *aaiC* e *aaiA* e comparar os resultados utilizando marcadores moleculares e o padrão de adesão. Formação de biofilme, pesquisa de outros genes associado à virulência de EAEC, resistência a antimicrobianos, filogenia e sorotipagem, também foi realizada. No teste de adesão, 89 (89%) amostras apresentaram o padrão agregativo (AA) característico de EAEC. Utilizando somente os marcadores moleculares, 5% das amostras foram classificadas como EAECt (*aggR*) e 9% como EAECa (*aaiC* e/ou *aaiA*). Das 89 EAEC analisadas, 79 (86,7%) apresentaram formação de biofilme. As 14 (15,7%) amostras que apresentaram um dos genes utilizados como marcador molecular foram testadas para resistência a antimicrobianos, outros genes de virulência associados à EAEC, filogenia e sorotipagem. Foi verificada resistência a ampicilina em seis amostras (42,8%) e duas (14,2%) ao trimetoprim-sulfametoxazol. O gene *astA* foi encontrado em nove amostras (64,3%), *aggA* em cinco (35,7%) e o gene *shf* em três amostras (21,4%). Na análise filogenética as amostras foram classificadas em três grupos: quatro (28,6%) no A, sete (50%) no B1 e três (21,4%) no E. Foram identificados 10 sorotipos diferentes: O93:H9; O3:H2; O140:H20; O152:H8; O175:H7; O93:H19; O113:H21; O70:H8; ONT:H21 e ONT:H8. De acordo com nossos resultados o padrão de adesão continua sendo o melhor teste para detectar EAEC, uma vez que pelo diagnóstico molecular 84,3% das amostras deixaram de ser caracterizadas como EAEC. Os resultados mostram que a carne moída bovina pode ser considerada um importante reservatório de EAEC, o que traz preocupação para a saúde pública pela possibilidade de transmissão deste patótipo ao homem através de alimentos contaminados.

Palavras-Chave: Carne moída. EAEC. Sorotipos. Genes de virulência.

LIMA, Nicole Ribeiro. **Prevalence and characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in ground beef samples in the city of Londrina, PR.** 2016. 42 p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an emerging pathogen that can cause acute and persistent diarrhea in children and adults. Outbreaks of diarrhea in several countries were associated with EAEC by ingestion of contaminated food. In recent years, molecular diagnosis to characterize typical EAEC (EAECt) using the *aatA* and *aggR* genes and for atypical EAEC (EAECa) the *aaiC* and *aaiA* genes, has been used as an alternative to the adhesion test. Thus, the present study aimed to investigate the prevalence of tEAEC and aEAEC in 100 bovine ground beef samples in the city of Londrina, through the adhesion test in HEp-2 cells and the search of the *aatA*, *aggR*, *aaiC* and *aaiA* genes. Biofilm formation, investigation of other genes associated to the virulence of EAEC, resistance to antimicrobials, phylogeny and serotyping, were also performed. In the adhesion test, 89 (89%) samples presented the aggregative adhesion (AA), characteristic of EAEC. Using only the molecular markers, 5% of the samples were classified as tEAEC (*aggR*) and 9% as aEAEC (*aaiC* and / or *aaiA*). Of the 89 EAEC analyzed, 79 (86.7%) presented biofilm formation. The 14 (15.7%) samples that presented one of the genes used as molecular marker were tested for resistance to antimicrobials, other virulence genes associated with EAEC, phylogeny and serotyping. Resistance to ampicillin was verified in six samples (42.8%) and two (14.2%) to trimethoprim-sulfamethoxazole. The *astA* gene was found in nine samples (64.3%), *aggA* in five (35.7%) and *shf* gene in three samples (21.4%). In the phylogenetic analysis, the samples were classified into three groups: four (28.6%) in A, seven (50%) in B1 and three (21.4%) in E. Ten different serotypes were identified: O93:H9; O3:H2; O140:H20; O152:H8; O175:H7; O93:H19; O113:H21; O70:H8; ONT:H21 and ONT:H8. According to our results, the adhesion pattern remains the best test to detect EAEC, since by the molecular diagnosis 84.3% of the samples were no longer characterized as EAEC. The results show that bovine ground meat can be considered an important reservoir of EAEC, which causes concern for public health by the possibility of transmission of this pathogen to man through contaminated food.

Keywords: Ground beef. EAEC. Serotypes. Virulence genes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1.	<i>Escherichia coli</i>	10
2.2.	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	11
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
4	TRABALHO CIENTÍFICO	25
5	CONCLUSÕES	40

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a bovinocultura de corte tem extrema importância e cerca de 80% da produção é destinada ao mercado interno, mostrando que o Brasil apresenta um alto consumo de carne bovina.

Dentre os produtos cárneos, a carne moída é amplamente consumida pela população. Entretanto, é um excelente meio para a multiplicação de microrganismos pela sua constituição e manipulação, podendo ser responsável pela transmissão de doenças para o homem através de bactérias patogênicas como: *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* sp; *Campylobacter* sp e principalmente *Escherichia coli*.

Apesar de *E. coli* fazer parte da microbiota intestinal humana e proporcionar benefícios para seus hospedeiros, algumas cepas dessa espécie podem causar danos à saúde como: infecções no sistema urinário, no sistema nervoso central, sepse e gastroenterites.

E. coli associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e estão agrupadas em oito categorias. Dentre elas, tem-se *E. coli* enteroagregativa (EAEC), caracterizada pela habilidade em produzir o padrão de adesão agregativo (AA) em cultura de células epiteliais. EAEC podem ser classificadas como EAEC típica para as cepas que apresentam o padrão AA e o gene regulador *aggR* e EAEC atípica para as que apresentam o padrão AA mas não apresentam o gene *aggR*.

EAEC tem-se apresentado como um patógeno emergente em vários países e estudos buscam uma compreensão mais detalhada deste patótipo, na qual ainda é bastante heterogêneo em relação aos seus fatores de virulência e pouco compreendido perante as outras DEC. Poucos estudos trazem uma caracterização mais detalhada destas cepas, a maioria se limita a pesquisar apenas o gene plasmidial *aggR* e, por consequência, só caracterizam as cepas EAEC típicas.

Com o alto consumo de carne bovina no Brasil, também aumentam os riscos de contaminação em humanos com cepas patogênicas de *E. coli*, como EAEC. Devido aos possíveis perigos acarretados à saúde pública por este patótipo,

são necessários estudos que evidenciem a distribuição e frequência destas cepas, além das características de virulência, no sentido de melhor conhecer a epidemiologia dessas infecções.

Assim, vimos à necessidade de realizar uma pesquisa mais detalhada sobre EAEC em cepas isoladas de carne moída comercializadas na cidade de Londrina, PR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A bovinocultura de corte representa um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil tem o segundo maior rebanho comercial do mundo, alcançando cerca de 200 milhões de cabeças. A extensão territorial e o clima tropical do Brasil contribuem para esse resultado, já que permitem a criação da maioria do gado em pastagens (MAPA, 2015).

Um produto oriundo da carne bovina largamente consumido é a carne moída que é obtida a partir da moagem de massa muscular de carcaças de bovinos e deve ser imediatamente resfriada ou congelada (MAPA, 2003).

A carne moída destaca-se entre os produtos cárneos, pela sua aceitabilidade e por se caracterizar como produto popular, sendo acessível a toda população incluindo a de menor poder aquisitivo, além de poder ser usada em refeições de maneiras práticas e variadas (MOTTA; BELMONTE; PANETTA, 2000). Os alimentos cárneos, particularmente aqueles que passam por intenso manuseio como o caso da carne moída, se constituem de excelente meio de cultura devido a elevada porcentagem de umidade, pH próximo à neutralidade e composição rica em nutrientes, favorecendo assim a instalação e multiplicação de uma diversidade de microrganismos capazes de provocar toxinfecções no homem (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

A carne está exposta às contaminações microbianas em todas as fases do seu processamento, principalmente, nas operações em que é mais manipulada e não são tomados os devidos cuidados em relação às Boas Práticas de Higiene (HOBBS; ROBERTS, 1999; PARDI; 2001; SILVEIRA et al., 2008).

O trato gastrointestinal dos animais é uma das fontes mais importantes de microrganismos, logo, a evisceração deve ser conduzida cuidadosamente, evitando que os microrganismos do intestino atinjam a carcaça. Para isso, medidas preventivas são imprescindíveis durante o abate, como a oclusão do reto e esôfago (PARDI, 2001).

2.1 *Escherichia coli*

E. coli faz parte da microbiota intestinal humana proporcionando

benefícios para seus hospedeiros. No entanto, determinadas cepas de *E. coli* são reconhecidamente patogênicas devido à presença de um ou mais genes de virulência encontrados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, bacteriófagos, ilhas de patogenicidade e transposons. *E. coli* patogênicas podem provocar doenças intestinais e extraintestinais em humanos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Uma característica importante que vem sendo descrita é a resistência a múltiplos antibióticos em isolados bacterianos de origens diversas (KAHALI et al., 2004; ERB et al., 2007; REBELLO; REGUA-MANGIA, 2014).

E. coli associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e estão agrupadas em oito categorias. Estes grupos são classificados como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) (CLEMENTS et al., 2012).

A carne e os produtos cárneos têm sido implicados em surtos de doenças causadas por DEC em vários países (RHOADES et al., 2009; KARMALI et al., 2010).

2.2 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

As cepas de EAEC são identificadas por sua habilidade em produzir o seu padrão de adesão agregativo (AA) em cultura de células epiteliais, como em células HEp-2 e HeLa. O padrão AA foi descrito por Nataro et al. (1987) em um estudo examinando diferentes padrões de adesão de cepas de *E. coli* obtidas de crianças chilenas com diarreia. O padrão AA é definido como uma ligação íntima das bactérias as células epiteliais em uma forma de “tijolo empilhado”, na qual podem incluir bactérias mostrando adesão na superfície da lamínula e/ou nas células epiteliais formando arranjos que remetem aos favos de uma colméia e ainda formando cordões entre uma célula epitelial a outra (NATARO et al., 1987; GIOPPO, et al., 2000).

EAEC está presente em surtos de diarreia associados pela ingestão de alimentos e água contaminadas (NATARO, et al., 2006; ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012), à diarreia do viajante em adultos que retornaram de viagens oriundas de países subdesenvolvidos (HUANG, et al., 2007; PASCHKE, et al., 2011) e também com diarreia crônica de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (GASSAMA-SOW, et al., 2004; MEDINA, et al., 2010; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Quatro surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) foram relatados no Japão. O primeiro, causado por uma cepa EAEC não tipável, que envolveu 2697 alunos na cidade de Tajimi que comeram uma merenda escolar que foi identificada como a causa do surto. A merenda continha alimentos como pão, macarrão, pudim de leite, legumes fritos e leite; e os principais sintomas foram dor de estômago, náusea e diarreia (ITOH et al., 1997). O segundo envolveram alunos de ensino médio e o terceiro adultos em uma festa, e foram associados com EAEC pertencentes aos sorogrupos O126 e O111, respectivamente (YATSUYANAGI et al., 2002). Em 2005, ocorreu um surto de origem alimentar no instituto de polícia da província de Shizuoka, no Japão. Sete membros apresentaram sintomas como diarreia e febre e a EAEC O126:H27 foi isolada (HARADA et al., 2007).

Outros quatro surtos de DTAs foram descritos no Reino Unido, envolvendo restaurantes, jantares organizados para o Natal e uma conferência (SMITH et al., 1997). Na Itália, dois surtos de EAEC afetaram 24 pessoas que ingeriram queijo não pasteurizado contaminado (SCAVIA et al., 2008). No Brasil, EAEC foi detectada em leite de mamadeiras de lactantes de baixo nível sócio econômico que haviam sido atendidos em ambulatórios de hospitais públicos, o que favorece a possibilidade de infecção por EAEC a partir de alimentos contaminados (MORAIS; GOMES; SIGULEM, 1997).

Em 2011, uma amostra de *E. coli* (sorotipo O104:H4) produtora de toxina shiga do tipo 2 (Stx2) causou um surto de diarreia de grandes proporções atingindo o norte da Alemanha. Foram afetados 4.321 indivíduos, sendo que 900 destes desenvolveram a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), ocasionando mais de 50 mortes. A cepa responsável por este grave surto foi um híbrido de EAEC e EHEC, uma *E. coli* do sorotipo O104:H4 que carregava fatores de virulência

encontrados em EAEC como o *aggR* (aggregative adherence regulator) *aatA* (anti-aggregation protein transporter), além do gene que codifica a toxina Stx2 de STEC (BIELASZEWSKA et al., 2011; GRAD et al., 2012).

Nas últimas décadas, um crescente número de estudos tem associado EAEC com casos de diarreia aguda (duração menor que 14 dias) em crianças e adultos que vivem tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Enquanto isso, casos de diarreia persistente por EAEC (duração igual ou superior a 14 dias) têm sido relatados em crianças que residem nos países subdesenvolvidos (HUANG, et al., 2006; WEINTRAUB, 2007; OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

Os sintomas mais comuns associados à infecção por EAEC incluem diarreia aquosa e ocasionalmente diarreia mucóide, náuseas, anorexia, febre de baixo grau, ruídos intestinais e tenesmo (OKHUYSEN, et al., 2004; NATARO, et al., 2006). Casos crônicos da infecção por EAEC podem levar a subnutrição, crescimento debilitado e subdesenvolvimento mental em crianças (STREINER, et al., 1998). A diversidade dos sintomas clínicos pode ser devido à heterogeneidade entre os isolados de EAEC, à dose infecciosa e a fatores de susceptibilidade genética do hospedeiro, assim como, à resposta imune (HARRINGTON, DUDLEY; NATARO, 2006).

A patogenicidade da infecção por EAEC ainda não foi totalmente esclarecida. O maior obstáculo seria a identificação dos mecanismos de patogênese destas bactérias devido à heterogeneidade das cepas. Em suma, os dados de diversos estudos têm sugerido os três seguintes estágios para a patogênese de EAEC: (1) aderência à mucosa intestinal através de adesinas fimbriais e/ou afimbriais; (2) formação de biofilme, e (3) indução da resposta inflamatória e secreção de toxinas (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; JENSEN, et al., 2014).

No estágio inicial da patogênese, a ligação à mucosa intestinal é um passo essencial à colonização e produção da doença por EAEC (HICKS; CANDY; PHILLIPS, 1996). Diversos estudos demonstram que o padrão AA é associado principalmente com a presença de adesinas de origem fimbriais, como as *Aggregative Adherence Fimbriae* (AAFs) que incluem cinco principais variantes,

AAF/I (NATARO et al., 1992), AAF/II (CZECZULIN et al., 1997), AAF/III (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002), AAF/IV (BOISEN et al., 2008) e AAF/V (JØNSSON et al., 2015).

No processo de aderência a mucosa intestinal, ocorre a participação de outros genes que também contribuem com essa formação. Um deles é o gene *aap* (anti-aggregation protein dispersin), responsável por codificar a proteína dispersina. Esta proteína é secretada para o meio externo onde se liga ao lipopolissacarídeo da bactéria, neutralizando a carga negativa da superfície da célula bacteriana, diminuindo a autoaglutinação e favorecendo a dispersão da bactéria pela mucosa intestinal (VELARDE et al., 2007; SHEIKH et al., 2002). A dispersina requer um sistema de transporte do tipo ABC que é realizado por uma proteína transportadora codificada pelo gene *aatA*, que age diretamente como um poro para a translocação da proteína dispersina (NISHI et al., 2003).

O *aggR* é um importante gene da patogênese e das propriedades agregativas de EAEC. Estudos sobre a patogênese de EAEC são focados no regulador *transcricional AggR* e a expressão de vários fatores de virulência, tanto plasmidiais quanto cromossomais, dependem deste regulador (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Nataro e Kaper (1998) sugeriram o termo EAEC típica (EAECt) para as cepas que apresentavam o padrão AA e o gene regulador *aggR* e EAEC atípica (EAECa) para as que apresentavam o padrão AA mas, não apresentam o gene *aggR*.

O segundo estágio da patogênese da EAEC é a formação de biofilme, o que contribui para a persistência da infecção bacteriana e permite com que a bactéria escape do sistema imune, além de dificultar a ação dos agentes antimicrobianos (TOKUDA, et al., 2010). Ensaio para quantificar a formação de biofilme têm surgido como um possível método de triagem de cepas EAEC patogênicas (WAKIMOTO, et al., 2004; BANGAR; MAMATHA, 2008). O gene *shf* (*Shigella flexneri* homologue) não tem relação com a agregação na fase inicial de aderência, mas é importante na formação de múltiplas camadas no biofilme na fase de maturação, exercendo papel importante na capacidade de formação de biofilme (FUJIYAMA et al., 2008; VASCONCELLOS, 2009)

Após a formação do biofilme, inicia-se o processo de secreção de toxinas e indução de resposta inflamatória. A secreção de toxinas tem um papel importante nos casos de diarreia secretora, que é uma manifestação clínica típica da infecção por EAEC (JENSEN, et al., 2014).

Várias toxinas têm sido associadas a estes efeitos citotóxicos. Dentre elas Pet e EAST-1, codificadas por genes plasmidiais (ESLAVA et al., 1998; SAVARINO et al., 1993), e Pic, codificada por gene cromossômico (HENDERSON et al., 1999). A toxina Pet (plasmid-encoded toxin), pertence à classe de proteínas autotransportadoras (CZECZULIN et al., 1999; NAVARRO-GARCIA et al., 1998) e exerce a função de alterar o citoesqueleto dos enterócitos levando ao arredondamento e descolamento celular (NAVARROGARCIA et al., 1998). EAST- é uma enterotoxina termoestável codificada pelo gene *astA* (CZECZULIN et al., 1999). A toxina é responsável por alterar o transporte de íons gerando uma resposta secretória (SAVARINO et al., 1991; SAVARINO et al., 1993). Pic (protein involved in colonization) é uma proteína autotransportadora que apresenta atividade mucinolítica e de hemaglutinação (HENDERSON, et al., 1999; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Entretanto, o método ouro para a identificação de cepas de EAEC ainda continua sendo o teste de adesão em culturas de células epiteliais (NATARO, et al., 1987), uma vez que ainda não foi encontrado um determinante genético comum para todas as amostras deste patotipo (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; NATARO, 2005). Entretanto, nos últimos anos, diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção de genes de virulência de EAEC como alternativa ao ensaio de adesão, no qual é dispendioso, consome tempo e requer cultura de células e infra-estrutura adequada (BOISEN, et al., 2012; ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014).

Vários genes vêm sendo utilizados para o diagnóstico molecular na tentativa de obter uma técnica mais rápida, eficaz e que leve em conta a heterogeneidade das cepas de EAEC (HUANG; JIANG; DUPONT, 2003; TOKUDA, et al., 2010). Os genes *aggR* e *aatA*, presentes no plasmídeo pAA, são bastante utilizados na detecção de cepas enteroagregativas (MOON; PARK; KIM, 2005; CENNIMO, et al., 2007).

A maioria dos protocolos de PCR, ainda hoje, propõe apenas a detecção de genes plasmídiais, deixando de abordar a detecção genotípica de cepas atípicas (CERNA; NATARO; GARCIA-ESTRADA, 2003; RÜTTLER, et al., 2006). Algumas regiões cromossomais vêm sendo utilizadas para a detecção de cepas EAECa, como descritas por Jenkins, et al. (2006) e Andrade, Gomes e Elias (2014).

Dentre os genes cromossomais específicos para EAEC temos os genes *aaiC* e *aaiA* (DUDLEY, et al., 2006; LIMA, et al., 2013; ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014). Esses genes estão presentes na ilha de patogenicidade cromossomal inserida na região *pheU*, identificada na cepa EAEC 042 (O44:H18), e estudos demonstram que esta ilha é responsável pela codificação de componentes do sistema de secreção do tipo VI (DUDLEY, et al., 2006; MORIN, et al., 2013).

Em seu trabalho, Lima, et al. (2013) pesquisaram a prevalência de EAEC em um estudo de caso-controle em 166 crianças da região nordeste do Brasil. Para diagnosticar cepas EAEC foram utilizados os genes cromossomais *aaiC* e o gene plasmidial *aatA*, entretanto, o teste de adesão em cultura de células epiteliais não foi utilizado. Os resultados mostraram que EAEC foi detectada em 68 amostras, sendo o gene *aaiC* o mais prevalente.

Andrade, Gomes e Elias (2014) desenvolveram uma PCR multiplex para identificação de EAECt e atípica, utilizando como genes de diagnóstico o *aaiA*, *aaiG* (genes cromossomais) e *aggR*, *aatA* (genes plasmidiais). Os autores trabalharam com uma coleção que incluía 58 EAEC (38 típicas e 20 atípicas). Entretanto, o ensaio detectou 55 EAEC, sendo que 38 eram típicas e 17 atípicas. Isso ocorreu devido três amostras terem apresentado o padrão de adesão, mas não terem apresentado nenhum gene de diagnóstico. Como resultado, o método de diagnóstico molecular apresentou-se com 94,8% de sensibilidade, 94,3% de especificidade e foi capaz de detectar os dois grupos de EAEC nas amostras pesquisadas e de acordo com os autores a PCR multiplex descrita é uma excelente ferramenta para diagnóstico molecular de ambas EAEC.

E. coli apresenta antígenos de superfície que possibilitam a classificação em sorogrupos (tipagem do antígeno somático "O") e sorotipos

(tipagem dos antígenos somático “O” e flagelar “H”) (EWING, 1986). Estudos epidemiológicos por meio da sorotipagem de EAEC evidenciam uma grande diversidade de sorotipos (CZECZULIN et al., 1999; JENKINS et al., 2006; KNUTTON et al., 1992; PIVA et al., 2003; UBER et al., 2006; ZAMBONI et al., 2004).

As cepas de *E. coli* são classificadas em sete principais grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E e F. A classificação filogenética proposta por Clermont et al. (2013) tem sido utilizada como uma maneira rápida e simples de classificar cepas de *E. coli*.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo pesquisar a prevalência de EAECt e atípica em carne moída na cidade de Londrina através do teste de adesão em células HEp-2 e da pesquisa dos genes plasmidiais (*aatA* e *aggR*) e cromossômicos (*aaiC* e *aaiA*) e comparar os resultados utilizando marcadores moleculares e o padrão de adesão. Nós também caracterizamos os isolados com base na formação de biofilme, genes adicionais de virulência de EAEC, resistência antimicrobiana, filogenia e sorotipagem.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, F. B., GOMES, T. A. T., ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106, p. 16-18, 2014.
- BANGAR, R., MAMATHA, B. Identification of Enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, South India. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 62, p. 8-12, 2008.
- BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4302-4311, 2002.
- BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCH, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Characterisation of the enteroaggregative *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 671-676, 2011.
- BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 3281-3292, 2008.
- BOISEN, N., SCHEUTZ, F., RASKO, D. A., REDMAN, J. C., PERSSON, S., SIMON, J., KOTLOFF, K. L., LEVINE, M. M., SOW, S., TAMBOURA, B., TOURE, A., MALLE, D., PANCHALINGAM, S., KROGFELT, K. A., NATARO, J. P. Genomic characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, p. 431-444, 2012.
- CENNIMO, D. J., KOO, H., MOHAMED, J. A., HUANG, D. B., CHIANG, T. Enteroaggregative *Escherichia coli*: a review of trends, diagnosis, and treatment. **Infections in Medicine**, p. 100 –110, 2007.
- CERNA, J. F., NATARO, J. P., GARCIA-ESTRADA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2138-2140, 2003.
- CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71-87, 2012.
- CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, p. 58-65, 2013.
- CZECZULIN, J. R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 4135-4145, 1997.

CZECZULIN, J. R., WHITTAM, T. S., HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA, F., NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of Enteroaggregative and Diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DUDLEY, E. G., THOMSON, N. R., PARKHILL, J., MORIN, N. P., NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, p. 1267-1282, 2006.

ERB, A.; STÜRMER T.; MARRE R.; BRENNER, H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 26: 83-90, 2007.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporter enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3155-3163, 1998.

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

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. 4 ed. New York: Elsevier Publishing, 536 p., 1986.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993.

FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of Enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Current Microbiology**, v. 56, p. 474-480, 2008.

GASSAMA-SOW, A., SOW, P. S., GUÈYE, M., GUÈYE-N'DIAYE, A., PERRET, J. L., M'BOUP, S., AÏDARA-KANE, A. 2004. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 75-78, 2004.

GIOPPO, N. M., ELIAS, W. P. Jr., VIDOTTO, M. C., LINHARES, R. E., SARIDAKIS, H. O., GOMES, T. A., TRABULSI, L. R., PELAYO, J. S. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* isolated from children with and without diarrhea in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, p. 293-298, 2000.

GRAD, Y. H.; LIPSITCH, M.; FELDGARDEN, M.; ARACHI, H. M.; CERQUEIRA, G. C.; FITZGERALD, M.; GODFREY, P.; HASS, B. J.; MURPHY, C. I.; RUSS, C. et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 3065-3070, 2012.

HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative

Escherichia coli serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 60, p. 154-155, 2007.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HENDERSON, I. R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HICKS, S., CANDY, D. C., PHILLIPS, A. D., Adhesion of Enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4751-4760, 1996.

HOBBS, B.C; ROBERTS, D. **Toxiinfecções e controle higiênico-sanitária de alimentos**. Varela, São Paulo, p. 425, 1999.

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

HUANG, D. B., MOHAMED, J. A., NATARO, J. P., DUPONT, H. L., JIANG, Z. D., OKHUUSEN, P. C. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of Enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travelers to developing countries. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1386-1392, 2007.

HUANG, D. B., NATARO, J. P., DU-PONT, H. L., KAMAT, P. P., MHATRE, A. D., OKHUUSEN, P. C., CHIANG, T. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 556-563, 2006.

ITOH, Y., NAGANO, I., KUNISHIMA, M. & EZAKI, T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable : H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2546–2550, 1997.

JENKINS, C., TEMBO, M., CHART, H., CHEASTY, T., WILLSHAW, G. A., PHILLIPS, A. D., TOMPKINS, D., SMITH H. Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1493-1497, 2006.

JENSEN, B. H., OLSEN, K. E. P., STRUVE, C., KROGFELT, K. A., PETERSENA, A. M. Epidemiology and clinical manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 614-630, 2014.

JØNSSON, R.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; MATEIU, R. V.; SANTIAGO, A. E.; JENSSEN, H.; NATARO, J. P.; KROGFELT, K. A. Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, p. 1396-1405, 2015.

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

KAHALI, S., SARKAR, B., RAJENDRAN, K., KHANAM, J., YAMASAKI, S., NANDY, R. K., BHATTACHARYA, S. K., RAMAMURTHY, T. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **Journal of Clinical Microbiology**, 42: 4111-4120, 2004.

KARMALI, M.A., GANNON, V., SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology** v. 140, p. 360–370, 2010.

KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; BHAN, M. K.; SMITH, H. R.; MCCONNELL, M. M.; CHEASTY, T.; WILLIAMS, P. H.; BALDWIN, T. J. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2083-2091, 1992.

LIMA, I. F., BOISEN, N., QUETZ, J. S., HAVT, A., CARVALHO, E. B., SOARES, A. M., LIMA N. L., MOTA R. M., NATARO J. P., GUERRANT R. L., LIMA A. A. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v. 62, p. 683-693, 2013.

MEDINA, A. M., RIVERA, FP, ROMERO, L. M., KOLEVIC, L. A., CASTILLO, M. E., VERNE, E., HERNANDEZ, R., MAYOR, Y. E., BARLETTA, F., MERCADO, E., OCHOA, T. J. Diarrheagenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus (HIV) pediatric patients in Lima, Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p.158-163, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003**. Disponível em: <<http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=666>> Acesso em 20/04/2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Bovinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>> Acesso em 20/12/2015.

MOON, J. Y., PARK, J. H., KIM, Y. B. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on Enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 215-220, 2005.

MORAIS, T. B.; GOMES, T. A.; SIGULEM, D. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. **Lancet**. v. 349 p. 1448-1449, 1997.

MORIN, N., SANTIAGO, A. E., ERNST, R. K., GUILLOT, S. J., NATARO, J. P. Characterization of the *AggR* regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 122-132, 2013.

MOTTA, M. R. A.; BELMONTE, M. A.; PANETTA, J. C. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, p.59-62, 2000.

- NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, p. 4-8, 2005.
- NATARO, J. P., KAPER, J. B., ROBINS-BROWNE, R., PRADO, V., VIAL, P., LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, p. 829-831, 1987.
- NATARO, J. P., DENG, Y., MANEVAL, D. R., GERMAN, A. L., MARTIN, W. C., LEVINE, M. M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2297-2304, 1992.
- NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, p. 142-201, 1998.
- NATARO, J. P., MAI, V., JOHNSON, J., BLACKWELDER, W. C., HEIMER, R., TIRRELL, S., EDBERG, S. C., BRADEN, C. R., GLENN-MORRIS, J. Jr., HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 402–407, 2006.
- NAVARRO-GARCÍA, F.; ESLAVA, C.; VILLASECA, J. M.; LÓPEZ-REVILLA, R.; CZECZULIN, J. R.; SRINIVAS, S.; NATARO, J. P.; CRAVIOTO, A. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66 p. 3149-3154, 1998.
- NAVARRO-GARCIA, F., ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of Enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, p. 13-24, 2011.
- NISHI, J., SHEIKH, J., MIZUGUCHI, K., LUISI, B., BURLAND, V., BOUTIN, A., ROSE, D. J., BLATTNER, F. R., NATARO, J. P. The export of coat protein from Enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 45680-45689, 2003.
- OKHUUSEN, P. C., DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. 503-506, 2010.
- OKHUUSEN, P. C., JIANG, Z. D., CARLIN, L., FORBES, C., DUPONT, H. L. Post-diarrhea chronic intestinal symptoms and irritable bowel syndrome in North American travelers to Mexico. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 99, p. 1774-1778, 2004.
- PARDI, M.C. **Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação**. Universidade Federal Fluminense. EDUFF – Editora Universitária, p. 623, 2001.
- PASCHKE, C., APELT, N., FLEISCHMANN, E., PERONA, P., VALENTINY, C., LÖSCHER, T., HERBINGER, K. H. Controlled study on enteropathogens in travelers returning from the tropics with and without diarrhoea. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1194-1200, 2011.
- PIVA, I.C.; PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S. N.; VIEIRA, A. C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; GIUGLIANO, L. G. Virulence

markers of enteroagregative *Escherichia coli* from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1827-1832, 2003.

REBELLO, R. C.; REGUA-MANGIA, A. H. Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 19-27, 2014.

RHOADES, J.R., DUFFY, G., KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. **Food Microbiology**, v. 26, p. 357–376, 2009.

RÜTTLER, M. E., YANZÓN, C. S., CUITIÑO, M. J., RENNA, N. F., PIZARRO, M. A., ORTIZ, A. M. Evaluation of a multiplex PCR method to detect Enteroagregative *Escherichia coli*. **Biocell**, v. 30, p. 301-308, 2006.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D. C.; LEVINE, M. M. Enteroagregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. **Journal of Clinical Investigation.**, v. 87, p. 1450-1455, 1991.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroagregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 3093-3097, 1993.

SCAVIA, G.; STAFFOLANI, M.; FISICHELLA, S.; STRIANO, G.; COLLETTA, S.; FERRI, G.; ESCHER, M.; MINELLI, F.; CAPRIOLI, A. Enteroagregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1141-1146, 2008.

SHEIKH, J.; CZECZULIN, J. R.; HARRINGTON, S.; HICKS, S.; HENDERTON, I. R.; LÉBOUGUÉNEC, C.; GOUNON, P.; PHILLIPS, A.; NATARO, J. P. A novel dispersin protein in enteroagregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 1329-1337, 2002.

SILVEIRA, N.; SILVA, N.; CONTRERAS, C. MIYAGUSKU, L.; BACCIN, M.L.F.; SOFOS, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, v.78, p.3-13, 2008.

SMITH, H. R., CHEASTY, T. & ROWE, B. Enteroagregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **The Lancet**, v. 350, p. 814–815, 1997.

STREINER, T. S., LIMA, A. A., NATARO, J. P., GUERRANT, R. L. Enteroagregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 88-96, 1998.

TOKUDA, K., NISHI, J., IMUTA, N., FUJIYAMA, R., KAMENOSONO, A., MANAGO, K., KAWANO, Y. Characterization of typical and atypical Enteroagregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p. 320-329, 2010.

UBER, A. P.; TRABULSI, L. R.; IRINO, K.; BEUTIN, L.; GHILARDI, A. C. R.; GOMES, T. A. T.; LIBERATORE, A. M. A.; CASTRO, A. F. P.; ELIAS, W. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, p. 251-257, 2006.

VASCONCELLOS, F. M. **Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf.** 2009. 96f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VELARDE, J. J.; VARNEY, K. M.; INMAN, K. G.; FARFAN, M.; DUDDLEY, E.; FLETCHER, J.; WEBER, D. J.; NATARO, J. P. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 66, p. 1123-1135, 2007.

WAKIMOTO, N., NISHI, J., SHEIKH, J., NATARO, J. P., SARANTUYA, J., IWASHITA, M., MANAGO, K., TOKUDA, K., YOSHINAGA, M., KAWANO, Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 687-690, 2004.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 4-8, 2007.

YATSUYANAGI, J., SAITO, S., SATO, H., MIYAJIMA, Y., AMANO, K. & ENOMOTO, K. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 294–297, 2002.

ZAMBONI, A.; FABRICOTTI S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1058-1063, 2004.

4 TRABALHO CIENTÍFICO

*Artigo em elaboração que será submetido à revista *International Journal of Food Microbiology*.

Prevalência e caracterização de *Escherichia coli* enteroagregativa em amostras de carne moída na cidade de Londrina, PR.

^a Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa postal 10011, 86 057 – 970 Londrina, PR, Brasil

Resumo

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um patógeno emergente que pode causar diarreia aguda e persistente, em crianças e adultos. Surtos de diarreia em vários países foram associados à EAEC pela ingestão de alimentos contaminados. Nos últimos anos, diagnóstico molecular para caracterizar EAEC típica (EAECt) utilizando os genes *aatA* e *aggR* e para EAEC atípica (EAECa) os genes *aaiC* e *aaiA*, vem sendo utilizado como alternativa ao teste de adesão. Assim, o presente estudo teve como objetivo pesquisar a prevalência de EAECt e EAECa em 100 amostras de carne moída bovina na cidade de Londrina, através do teste de adesão em células HEp-2 e da pesquisa dos genes *aatA*, *aggR*, *aaiC* e *aaiA* e comparar os resultados utilizando marcadores moleculares e o padrão de adesão. Formação de biofilme, pesquisa de outros genes associado à virulência de EAEC, resistência a antimicrobianos, filogenia e sorotipagem, também foi realizada. No teste de adesão, 89 (89%) amostras apresentaram o padrão agregativo (AA) característico de EAEC. Utilizando somente os marcadores moleculares, 5% das amostras foram classificadas como EAECt (*aggR*) e 9% como EAECa (*aaiC* e/ou *aaiA*). Das 89 EAEC analisadas, 79 (86,7%) apresentaram formação de biofilme. As 14 (15,7%) amostras que apresentaram um dos genes utilizados como marcador molecular foram testadas para resistência a antimicrobianos, outros genes de virulência associados à EAEC, filogenia e sorotipagem. Foi verificada resistência a ampicilina em seis amostras (42,8%) e duas (14,2%) ao trimetoprim-sulfametoxazol. O gene *astA* foi encontrado em nove amostras (64,3%), *aggA* em cinco (35,7%) e o gene *shf* em três amostras (21,4%). Na análise filogenética as amostras foram classificadas em três grupos: quatro (28,6%) no A, sete (50%) no B1 e três (21,4%) no E. Foram identificados 10 sorotipos diferentes: O93:H9; O3:H2; O140:H20; O152:H8; O175:H7; O93:H19; O113:H21; O70:H8; ONT:H21 e ONT:H8. De acordo com nossos resultados o padrão de adesão continua sendo o melhor teste para detectar EAEC, uma vez que pelo diagnóstico molecular 84,3% das amostras deixaram de

ser caracterizadas como EAEC. Os resultados mostram que a carne moída bovina pode ser considerada um importante reservatório de EAEC, o que traz preocupação para a saúde pública pela possibilidade de transmissão deste patótipo ao homem através de alimentos contaminados.

Palavras-Chave: carne moída, EAEC, sorotipos, genes de virulência

1. Introdução

Escherichia coli associadas à infecção intestinal, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênica (DEC) e estão agrupadas em oito patótipos, dentre eles, *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Clements et al., 2012).

EAEC é um patótipo emergente, encontrado tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos que podem causar diarreia aguda e persistente em crianças, diarreia do viajante em pessoas que retornaram de viagens oriundas de países subdesenvolvidos e também diarreia crônica em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Adachi et al., 2002; Okeke, Nataro, 2001; Scaletsky et al., 2002).

Vários surtos de diarreia em países desenvolvidos foram causados por EAEC e associados à ingestão de alimentos contaminados (Harada et al., 2007; Itoh et al., 1997; Scavia et al., 2008 ; Yatsuyanagi et al., 2002). A carne e os produtos cárneos têm sido implicados em surtos de doenças transmitidas por alimentos causados por DEC em todo o mundo (Karmali et al., 2010; Rhoades et al., 2009).

A patogênese desencadeada por EAEC inclui um processo inicial de aderência à mucosa intestinal, onde se tem a participação de adesinas de origem fimbriais como as *Aggregative Adherence Fimbriae* (AAFs) com suas cinco variantes (AAF I-V) (Nataro et al., 1992; Czczulin et al., 1997; Bernier et al., 2002; Boisen et al., 2008) e a proteína anti-agregativa (dispersina) (Sheikh et al., 2002). O gene *shf* está relacionado com a formação de biofilme (Czczulin et al., 1999). Por fim, temos a toxina enteroagregativa termo-estável (EAST-1) (Menard; Dubreuil, 2002), a toxina autotransportadora (Pet) (Eslava et al., 1998) e a proteína envolvida na colonização (Pic) (Henderson et al., 1999) que exercem papel importante na indução da resposta inflamatória.

O método ouro para a identificação de cepas EAEC continua sendo o teste de adesão em culturas de células epiteliais (Nataro, et al., 1987). Entretanto, nos

últimos anos, diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção de genes de virulência de EAEC como alternativa ao teste de adesão, no qual é caro, consome tempo e requer cultura de células e infra-estrutura adequada (Estrada-Garcia; Navarro-Garcia, 2012, Andrade et al., 2014).

Devido à heterogeneidade das cepas de EAEC, múltiplos genes vêm sendo utilizados para o diagnóstico (Huang et al., 2003; Tokuda, et al., 2010). Os genes plasmidiais *aatA* e o *aggR* são bastante utilizados na detecção de cepas enteroagregativas (Baudry, et al., 1990; Moon et al., 2005; Cennimo, et al., 2007).

Em 1998, Nataro e Kaper sugeriram o termo EAEC típica (EAECt) para cepas que apresentavam o gene regulador *aggR* e EAEC atípica (EAECa) para as que não apresentavam o gene *aggR* mas apresentavam o padrão de adesão agregativa.

A maioria dos protocolos de reações em cadeia da polimerase (PCR) propõe apenas a detecção de genes plasmidiais, no qual desfavorece a detecção de cepas atípicas (Cerna et al., 2003; Rüttler, et al., 2006). Algumas regiões cromossomais vêm sendo utilizadas para a detecção de cepas EAECa, como descritas por Jenkins, et al. 2006^a e Andrade et al. 2014.

Dentre os genes cromossomais específicos para EAEC temos os genes *aaiC* e *aaiA* que estão presentes na ilha de patogenicidade cromossomal inserida na região *pheU* (Dudley, et al., 2006; Lima, et al., 2013; Andrade et al., 2014). No trabalho realizado por Andrade et al. (2014), os genes cromossomais apresentaram uma alta sensibilidade e especificidade em detectar cepas de EAECa e os genes plasmidiais *aggR* e *aatA* para detectar EAECt, sugerindo a utilização desses genes para diagnóstico molecular de EAECt e EAECa.

Assim, o presente estudo teve como objetivo pesquisar a prevalência de EAECt e atípica em carne moída na cidade de Londrina, através do teste de adesão em células HEp-2 e pesquisa dos genes utilizados como marcadores molecular *aatA*, *aggR*, *aaiC* e *aaiA* e comparar os resultados utilizando marcadores moleculares e o padrão de adesão. Outros genes de virulência de EAEC, formação de biofilme, resistência a antimicrobianos, filogenia e sorotipagem, também foram estudados.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragem

O estudo foi realizado com 100 amostras de carne moída coletadas em 25 açougues e supermercados na cidade de Londrina, PR, no período de janeiro a novembro de 2014. Após as coletas, as amostras foram transportadas em condições isotérmicas até o Laboratório de Bacteriologia - Universidade Estadual de Londrina, onde foram realizadas as análises bacteriológicas.

2.2. Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

De cada amostra foram pesados, assepticamente, 25 gramas de carne e colocadas em 225 mL de água peptonada a 0,1 % e levadas ao aparelho Shaking (Grant Bio ES20) para homogeneização por 20 minutos, seguido de filtração, obtendo-se a diluição inicial de 10^{-1} .

A técnica utilizada para detecção de *E. coli* foi a do substrato cromogênico Colilert (SOVEREIGN – USA). Em um frasco estéril, contendo 100 mL da amostra na diluição 10^{-1} foi acrescentada assepticamente uma ampola do substrato Colilert. Após leve homogeneização, o conteúdo foi transferido para a cartela Quanti-Tray (WP2000) com 49 poços grandes e 48 pequenos. A cartela foi selada utilizando a seladora Quanti Tray Sealer (IDEXX/SOVEREIGN - USA). Incubou-se a cartela a 37°C (+/- 2°C) por 24 horas e foi feita a leitura dos poços que ficaram amarelos (indicador de coliformes totais). Para verificar a presença de *E. coli*, colocou-se a cartela frente (aproximadamente 13 cm) a lâmpada de luz ultravioleta (365 nm), e os poços amarelos que ficaram azul-fluorescente indicaram a presença de *E. coli*.

As amostras que apresentaram fluorescência foram inoculadas em caldo EC e incubadas a 44°C por 24 horas. Posteriormente as amostras foram semeadas em ágar MacConkey (MC) (HIMEDIA, ÍNDIA) e incubadas a 37°C por 18 horas. De cada placa de MC foram selecionadas quatro colônias presuntivas de *E. coli*, e então, identificadas bioquimicamente através do KIT, EPM, MILi e Citrato de Simon's (PROBAC - BRASIL). Os 400 isolados identificados bioquimicamente como *E. coli* foram armazenados em caldo infuso de coração e cérebro (BHI) (Difco - USA) com 20% de glicerol a -80°C.

2.3. Teste de adesão em células HEp-2

Todos os 400 isolados de *E. coli* foram testados para aderência em células HEp-2, de acordo com a técnica descrita por Cravioto et al. (1979), após 6 horas de interação bactéria-célula. As preparações foram observadas em microscópio óptico, em aumento de 1000 vezes e os padrões de adesão definidos conforme descrito previamente (Scaletsky et al., 1984; Nataro et al., 1987; Rodrigues et al., 1996).

2.4. Detecção de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) pela PCR

A metodologia utilizada para a extração do DNA bacteriano foi realizada conforme descrito por Lascowski et al. (2012). O sobrenadante foi utilizado nas PCR e todos os 400 isolados de *E. coli* foram submetidos para detecção dos genes plasmídiais (*aatA* e *aggR*) e dos genes cromossomais (*aaiA* e *aaiC*). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão listadas na Tabela 1.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler, em um volume final de 25 µL, contendo 2 µL do lisado bacteriano, 200 µM de dNTPs (Invitrogen™), 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen™), 25 pmol de cada iniciador (Invitrogen™) e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (Difco™), corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen™) e visualizado com o auxílio de transiluminador Ultra-Violeta (UV) ECX-20.M (Vilbert Loumart).

2.5. Teste de formação de Biofilme

Os 400 isolados de *E. coli* foram submetidos ao teste para quantificação de formação do biofilme conforme o método descrito por Bangar; Mamatha (2008). A formação de biofilme foi considerada quando o valor da densidade óptica a 570 nm (OD₅₇₀) foi acima de 0,2. A cepa EAEC 042 (O44:H18) foi utilizada como controle positivo e a *E. coli* HB101 (*E. coli* K-12) como controle negativo.

Os testes descritos a seguir foram realizados com as amostras que apresentaram positividade para algum gene de EAEC.

2.6. Pesquisa de outros genes de virulência de EAEC

A pesquisa de outros genes de virulência foi realizada pela PCR com os seguintes genes: EAST-1 (*astA*) (Mohamed et al., 2007), Pet (*pet*) (Restieri et al., 2007), Pic (*pic*) (Piva et al., 2003), dispersina (*aap*) (Boisen et al., 2012), *shf* (Czeczulin et al., 1999) e as quatro fímbrias (AAF I-IV) representadas

respectivamente pelos genes *aggA*, *aafA*, *agg3A* e *agg4A* (Boisen et al., 2012). As condições para a realização das reações e controles utilizados estão descritas nos respectivos estudos. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados nesse estudo estão presentes na Tabela 1.

2.7. Determinação dos grupos filogenéticos

Os grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E e F) foram determinados pela técnica da PCR de acordo com Clermont et al. (2013), utilizando o quadraplex com os marcadores *arpA*, *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2 (Tabela 1).

2.8. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

As amostras foram submetidas ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos pela técnica de disco difusão conforme descrito pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Os antimicrobianos (Oxoid™) utilizados foram: ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina-tazobactam (110 µg), ampicilina-sulbactam (20 µg) e sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg).

2.9. Sorotipagem

A determinação dos antígenos O e H foi realizada como descrito por Guinée et al. (1981) empregando todos os anti-soros disponíveis O e H: (O1-O186) e (H1-H56). A sorotipagem foi realizada pelo Dr. Armando Navarro na Universidad Nacional Autónoma de México, Cidade do México - México. Os isolados que não reagiram com os anti-soros O foram considerados como não tipável (ONT).

2.10. Análise estatística

A análise estatística foi calculada através do teste Qui-Quadrado utilizando o software R. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.0 Resultados e discussão

3.1. Prevalência de EAEC

No teste de adesão em células HEp-2 foram verificados diferentes fenótipos de adesão. Das 100 amostras analisadas, 89 apresentaram adesão AA, oito amostras apresentaram padrão não definido, duas aderiram difusamente e uma

apresentou-se não aderente. As 89 amostras que apresentaram o padrão de adesão AA foram classificadas como patotipo EAEC.

Nos últimos anos, alguns pesquisadores têm utilizado genes para diagnósticos moleculares para a detecção de EAECt e atípica como alternativa ao teste de adesão, que demanda tempo e infraestrutura adequada (Estrada-Garcia; Navarro-Garcia, 2012; Andrade et al., 2014). Em nosso trabalho, também utilizamos os genes para diagnóstico molecular *aggR* e *aatA* para caracterizar EAECt e *aaiC* e *aaiA* para caracterizar EAECa.

3.2. Prevalência dos genes de diagnóstico

Dentre as 89 amostras que apresentaram o padrão de adesão AA, 14 (15,73%) apresentaram algum marcador molecular associado à EAEC. Três amostras (3,37%) apresentaram os genes *aggR*, *aatA*, *aaiC* e *aaiA*; duas (2,24%) apresentaram os genes *aggR* e *aatA*, três (3,37%) apenas o gene *aaiC* e seis (6,74%) apenas o gene *aaiA*. O gene mais prevalente em nosso estudo foi o *aaiA*, que esteve presente em 9 amostras. Em contrapartida, Lima, et al. (2013) pesquisaram a prevalência de EAEC em um estudo de caso-controle em 166 crianças da região nordeste do Brasil utilizando os genes cromossômicos *aaiC* e o gene plasmidial *aatA*, e verificou que o gene *aaiC* foi o mais prevalente.

Das 89 amostras de EAEC, cinco (5,6%) foram consideradas EAECt por apresentarem adesão agregativa e serem positivas para o gene *aggR*; e 84 (94,4%) foram consideradas EAECa por apresentarem padrão de adesão agregativo e não apresentarem o gene *aggR*. A ausência do gene *aggR* na maioria das amostras EAEC positivas mostra que este gene pode não ser um bom marcador molecular para diagnosticar amostras EAEC (Lima et al., 2013).

Comparando os resultados obtidos na detecção de EAEC pelos marcadores moleculares com os resultados encontrados no teste de adesão, notamos que a prevalência de EAEC no teste de adesão (89%) foi significativamente maior do que a encontrada pelos marcadores moleculares (14%) ($p < 0,001$). Assim a técnica de PCR deixou de detectar 84,3% das amostras de EAEC que foram diagnosticadas pelo teste de adesão. Esses resultados sugerem que novos estudos são necessários a fim de encontrar um melhor marcador molecular para detectar EAEC e que apesar das limitações do teste de adesão, ele continua sendo o método mais eficaz em detecção do patotipo EAEC.

Andrade et al. (2014) desenvolveram uma PCR multiplex para identificação de EAECt e atípica, utilizando como genes de diagnóstico o *aaiA*, *aaiG* e *aggR*, *aatA*. Os autores trabalharam com uma coleção que incluía 58 EAEC (38 típicas e 20 atípicas). Entretanto, o ensaio detectou 55 EAEC, sendo que 38 eram típicas e 17 atípicas. Isso ocorreu devido três amostras terem apresentado o padrão de adesão, mas não terem apresentado nenhum gene de diagnóstico. Como resultado, o método de diagnóstico molecular foi capaz de detectar 94,82% das EAEC identificadas inicialmente pelo teste de adesão. Entretanto, nossos resultados mostram que o diagnóstico molecular foi capaz de detectar apenas 15,7% das EAEC que já haviam sido identificadas pelo teste de adesão, reforçando a ideia de que novos marcadores moleculares devem ser desenvolvidos.

3.3. Teste de formação de Biofilme

Das 89 EAEC analisadas, 79 (88,7%) apresentaram $OD_{570} > 0,2$ e foram consideradas como formadoras de biofilme, enquanto 10 (11,3%) apresentaram $OD_{570} \leq 0,2$ e foram consideradas não formadoras de biofilme. Das 79 amostras formadoras de biofilme, 74 (86%) amostras foram identificadas como EAECa e 5 (5,8%) EAECt. Nossos resultados corroboram com os encontrados por Mendez-Arancibia et al. (2008), que pesquisaram a formação de biofilme em 86 isolados de EAEC e encontraram 66 (76%) de amostras formadoras de biofilme.

A habilidade de EAEC na formação de biofilme contribui para a persistência da infecção bacteriana e permite com que a bactéria escape do sistema imune, além de tornar os microrganismos mais resistentes a agentes antimicrobianos (Tokuda, et al., 2010).

3.4. Suscetibilidade a antimicrobianos

Das 14 amostras submetidas ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos, oito (57,1%) foram resistentes a um antibiótico, enquanto seis (42,9%) não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos testados. A resistência para ampicilina foi de 42,9% (6/14) e 14,2% (2/14) para sulfametoxazol-trimetoprim.

Martínez e Villalobos (2008) encontraram resultados semelhantes aos nossos. Nas amostras de *E. coli* isoladas de alimentos encontraram (66,6%) das cepas resistência a ampicilina. Esse resultado mostra que o homem está exposto a bactérias resistentes aos antimicrobianos, podendo ser colonizado através da cadeia alimentar.

3.5. Outros genes de virulência de EAEC

A pesquisa de outros genes de virulência de EAEC foi realizada nas 14 amostras que apresentaram genes de diagnóstico de EAEC. Dos nove genes pesquisados, três estavam presentes nas amostras analisadas. O gene *astA* foi encontrado em nove (64,3%) amostras, *aggA* foi encontrado em cinco (35,7%) e o gene *shf* foi encontrado em três (21,4%) (Tabela 2). Kahali et al. (2004) pesquisaram genes de virulência em EAEC isoladas de pacientes hospitalizados com diarreia na Índia e encontraram o gene *astA* em 29,8% das amostras, *aggA* em 9,1% e *shf* em 65,3% das amostras. A variedade de genótipos que apresentam as bactérias com adesão agregativa dificulta o desenvolvimento de um teste de diagnóstico molecular para detecção de EAEC (Jenkins et al., 2006a).

3.6. Filogenia

A análise filogenética demonstrou que das 14 amostras analisadas, sete (50%) pertenciam ao grupo B1, quatro (28,6%) pertenciam ao grupo A, e três (21,4%) ao grupo E (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Rúgeles et al., (2010) onde as cepas de EAEC pertenciam aos grupos A e B1. Cepas de *E. coli* que pertencem aos grupos A e B1 estão associadas com patógenos intestinais (Gordon et al., 2008).

3.7. Sorotipagem

Das 14 amostras que foram encaminhadas para a sorotipagem, três amostras foram consideradas não tipáveis para o antígeno O (ONT). Todas as amostras foram tipáveis para o antígeno flagelar (H). Foram identificados 10 sorotipos diferentes: O93:H9; O3:H2; O140:H20; O152:H8; O175:H7; O93:H19; O113:H21; O70:H8; ONT:H21 e ONT:H8 (Tabela 2). Surtos alimentares no Japão foram associados com EAEC pertencentes aos sorogrupos O126 e O111 (YATSUYANAGI et al., 2002). Em um estudo realizado na Alemanha de 14 cepas de EAEC isoladas de crianças, todas pertenciam a sorotipos diferentes (Huppertz et al., 1997). Em outro estudo no Reino Unido, 93 de 143 cepas de EAEC foram sorotipadas e pertenciam a 47 sorotipos diferentes (Jenkins et al., 2006b). Assim, nota-se que o grupo das EAEC apresenta uma variedade de sorotipos O e H.

Muitos trabalhos se limitam a pesquisar apenas EPEC e STEC em amostras de carne bovina (Bergamini et al., 2007, Bosilevac; Koohmaraie, 2011, Timm et al.

2009) entretanto EAEC tem emergido como um importante patógeno associado a surtos alimentares (Bielaszewska et al., 2011, Harada et al., 2007, Itoh et al., 1997, Smith et al., 1997, Yatsuyanagi et al., 2002). Estudos pesquisando EAEC e outros patótipos de *E. coli*, não encontraram EAEC em produtos cárneos (Koo et al., 2012, Rúgeles et al., 2010, Xia et al., 2010). Este trabalho é o primeiro a realizar uma pesquisa mais detalhada dos genes de diagnóstico para EAEC em amostras de carne moída bovina e traz resultados importantes para a epidemiologia.

Concluimos que a carne moída bovina pode ser considerada um importante reservatório de EAEC, uma vez que perfis de virulência associados com doenças em humanos foram identificados. Assim, a ocorrência de EAEC é de grande preocupação em termos de saúde pública, principalmente devido à possibilidade de transmissão deste patótipo ao homem através de alimentos contaminados. Ainda, o padrão de adesão continua sendo o melhor teste para detectar EAEC, mostrando que mais estudos são necessários para definir um melhor marcador molecular para EAEC.

Agradecimentos

Agradecemos, ao Laboratório de Virologia (Universidade Estadual de Londrina) pelo fornecimento das culturas de células HEp-2 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Referências

- Adachi, J. A., C. D. Ericsson, Z. D. Jiang, M. W. DuPont, S. R. Pallegar, H. L. DuPont., 2002. Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. *Journal of Infectious Diseases* 185,1681–1683.
- Andrade, F. B., Gomes, T. A. T., Elias, W. P., 2014. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 106, p. 16-18.
- Bangar, R., Mamatha, B., 2008. Identification of Enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, South India. *Indian Journal of Medical Sciences*, v. 62, p. 8-12.
- Baudry, B., Savarino, S. J., Vial, P., Kaper, J. B., Levine, M. M., 1990. A sensitive and specific DNA probe to identify Enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 161, p. 1249-1251.

- Bergamini, A.M.M., Simões, M., Irino, K., Gomes, T.A.T., Guth, B.E.C., 2007. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p.553-556.
- Bernier, C., Gounon, P., Le Bouguéneq, C., 2002. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infection and Immunity*, v. 70, p. 4302-4311.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köch, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H., 2011. Characterisation of the enteroaggregative *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, p. 671-676.
- Boisen, N., Scheutz, F., Rasko, D. A., Redman, J. C., Persson, S., Simon, J., Kotloff, K. L., Levine, M. M., Sow, S., Tamboura, B., Toure, A., Malle, D., Panchalingam, S., Krogfelt, K. A., Nataro, J. P., 2012. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *Journal of Infectious Diseases*; 205:431–444.
- Boisen, N., Struve, C., Scheutz, F., Krogfelt, K. A., Nataro, J. P., 2008. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infection and Immunity*, v. 76, p. 3281-3292.
- Bosilevac, J. M., Koohmaraie, M., 2011. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:2103–2112.
- Cennimo, D. J., Koo, H., Mohamed, J. A., Huang, D. B., Chiang, T., 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli*: a review of trends, diagnosis, and treatment. *Infections in Medicine*, p. 100 –110.
- Cerna, J. F., Nataro, J. P., Garcia-Estrada, T., 2003. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 2138-2140.
- Clements, A., Young, J. C.; Constantinou, N.; Frankel, G., 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, v. 3, p. 71-87.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., Gordon, D. M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, v. 5, p. 58-65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute , 2010. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Twentieth informational supplement. Clinical And Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. CLSI document M100-S20, Vol 30, nº 1, replaces M100-S19, Vol. 29, nº. 3.

- 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. *Current Microbiology*. v. 3, p. 95-99.
- Cravioto, A., Nataro, J. P., 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 66, p. 3155-3163.
- Czczulin, J. R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M. H., Navarro-Garcia, F., Nataro, J. P., 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 65, p. 4135-4145.
- Czczulin, J. R., Whittam, T. S., Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J. P., 1999. Phylogenetic analysis of Enteroaggregative and Diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 2692-2699.
- 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*. *Molecular Microbiology*, v. 61, p. 1267-1282.
- Eslava, C., Navarro-garcía, F., Czczulin, J. R., Henderson, I. R., Cravioto, A., Nataro, J. P., 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 66, p. 3155-3163.
- Estrada-Garcia, T., Navarro-Garcia, F., 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 66, p. 281-298.
- Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., Denamur, E., 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental microbiology* ;10:2484–2496.
- Guinée, P. A. M., Jansen, H. W., Wadstroöm, T., Sellwood, R., 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: De Leeww, P.W., Guiné'e, P.A.M. (Eds.), *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea: Current Topics in Veterinary and Animal Science*, vol. 13. Martinus Nijhoff, Hague, The Netherlands, pp. 126–162.
- Harada, T., Hiroi, M., Kawamori, F., Furusawa, A., Ohata, K., Sugiyama, K., Masuda, T., 2007. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* v. 60, p. 154-155.
- Henderson, I. R.; Czczulin, J.; Eslava, C.; Noriega, F.; Nataro, J. P., 1999. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 5587-5596.
- Huang, D. B., Jiang, Z. D., Dupont, H. L., 2003. Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 69, p. 506-508.

Huppertz, H. I., Rutkowski, S., Aleksic, S., Karch, H., 1997. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. *Lancet*. 7;349(9066):1660–1662.

Itoh, Y., Nagano, I., Kunishima, M., Ezaki, T., 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable : H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 2546–2550.

Jenkins, C., Chart, H., Willshaw, G. A., Cheasty, T., Smith, H. R., 2006b. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 55, no. 1, pp. 13–19.

Jenkins, C., Tembo, M., Chart, H., Cheasty, T., Willshaw, G. A., Phillips, A. D., Tompkins, D., Smith, H., 2006a. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* 55:1493-1497.

Kahali, S., Sarkar, B., Rajendran, K., Khanam, J., Yamasaki, S., Nandy, R. K., Bhattacharya, S. K., Ramamurthy, T., 2004. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *Journal of Clinical Microbiology* , 42: 4111-4120.

Karmali, M.A., Gannon, V., Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology* v. 140, p. 360–370.

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. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 28, p. 1813-1816.

Lascowski KMS, Guth BEC, Martins FH, Rocha SPD, Irino K, Pelayo JS (2012) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 114:1230-1239.

Lima, I. F., Boisen, N., Quetz, J. S., Havt A, de Carvalho, E. B., Soares A. M., Lima, N. L., Mota, R. M., Nataro, J. P., Guerrant, R. L., Lima, A. Â., 2013. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulencerelated genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *Journal of Medical Microbiology*; 62:683-693.

Martínez, R. E., Villalobos, L. B., 2008. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de alimentos y aguas residuales en Cumaná, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente*, v. 20, n. 2, p. 172-176.

Menard, L.P., Dubreuil, J.D., 2002. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, 43-60.

Mendez-Arancibia, E., Vargas, M., Soto, S., Ruiz, J., Kahigwa, E., Schellenberg, D., Urassa, H., Gascón, J., Vila J., 2008. Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78:985-989.

Mohamed, J. A.; Huang, D. B.; Jiang, Z. D.; Dupont, H. L.; Nataro, J. P.; Belkind-Gerson, J.; Okhuysen, P. C., 2007. Association of putative Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *Journal Clinical Microbiology*, v. 45, p. 121–126.

Moon, J. Y., Park, J. H., Kim, Y. B., 2005. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on Enteroaggregative *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 253, p. 215-220.

Nataro, J. P., Deng, Y., Maneval, D. R., German, A. L., Martin, W. C., Levine, M. M., 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infection and Immunity*, v. 60, p. 2297-2304.

Nataro, J. P., Kaper, J. B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review*, v. 11, p. 142-201.

Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., Levine, M. M., 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 6, p. 829-831.

Okeke, I. N., J. P. Nataro. 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Lancet Infectious Diseases* 1:304–313.

Piva, I. C., Pereira, A. L., Ferraz, L. R., Silva, R. S., Vieira, A. C., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Giugliano L. G., 2003. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 1827-1832.

Restieri, C.; Garriss, G.; Locas, M. C.; Dozois, C. M., 2007. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 1553-1562.

Rhoades, J.R., Duffy, G., Koutsoumanis, K., 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microbiology*, v. 26, p. 357–376.

Rodrigues J, Scaletsky, I. C. A., Campos, L. C., Gomes, T. A. T., Whittan, S. T, Trabulsi, L. R., 1996. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infection and Immunity* , v. 64, p. 2.680-2.686.

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. *International Journal of Food Microbiology*, v. 138, p. 282-286.

Rüttler, M. E., Yanzón, C. S., Cuitiño, M. J., Renna, N. F., Pizarro, M. A., Ortiz. A. M., 2006. Evaluation of a multiplex PCR method to detect Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Biocell*, v. 30, p. 301-308.

Scaletsky, I. C., S. H. Fabbricotti, S. O. Silva, M. B. Morais, Fagundes-Neto, U., 2002. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 8:855–858.

Scaletsky, I. C.; Silva, M. L.; Trabulsi, L. R., 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 45, p. 534-536.

Scavia, G., Staffolani, M., Fisichella, S., Striano, G., Colletta, S., Ferri, G., Escher, M., Minelli, F., Caprioli, A., 2008. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 57, p. 1141-1146.

Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J., Karch, H., 1995. Development of PCR for screening of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 701-705.

Sheikh, J., Czczulin, J. R., Harrington, S., Hicks, S., Henderton, I. R., Lebouguéneq, C., Gounon, P., Phillips, A., Nataro, J. P., 2002. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, v. 110, p. 1329-1337.

Smith, H. R., Cheasty, T., Rowe, B., 1997. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. *The Lancet*, v. 350, p. 814–815.

Timm, C. D., Conceição, F. R., Menin, A., Conceição, R. C. S., Dellagostin, O. A., Aleixo, J. A. G., 2009. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in southern Brazil isolated from ground beef and raw milk. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 2, p. 641-649.

Tokuda, K., Nishi, J., Imuta, N., Fujiyama, R., Kamenosono, A., Manago, K., Kawano, Y., 2010. Characterization of typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. *Microbiology and Immunology*, v. 54, p. 320-329.

Xia, X., Meng, J., Mcdermott, P. F., Ayers, S., Blickenstaff, K., Tran, T. T., Abbott, J., Zheng, J., Zhao, S., 2010. Presence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, pg. 1709-1717.

Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K., Enomoto, K., 2002. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 294–297.

5 CONCLUSÃO

A carne moída bovina pode ser considerada um importante reservatório de EAEC, uma vez que perfis de virulência associados com doenças em humanos foram identificados. Assim, a ocorrência de EAEC é de grande preocupação em termos de saúde pública, principalmente devido à possibilidade de transmissão deste patotipo ao homem através de alimentos contaminados. Ainda, o padrão de adesão continua sendo o melhor teste para detectar EAEC, mostrando que novos estudos são necessários a fim de encontrar um marcador molecular mais eficiente.

Tabela .1 - Sequência dos oligonucleotídeos pesquisados e tamanho dos fragmentos de DNA amplificados.

Gene	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	Referência
<i>aatA</i>	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCATC (R) AATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	Schmidt et al. (1995)
<i>aggR</i>	(F) GCAATCAGATTAARCAGCGATACAC (R) ATTCTTGATTGCATAAGGATCTGG	426	Boisen et al. (2012)
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTTCAGGATTGCCATTAG	476	Dudley et al. (2006)
<i>aaiC</i>	(F) ATTGTCCTCAGGCATTTCCACACG (R) ACACCCCTGATAAACAA	215	Lima et al. (2013)
<i>shf</i>	(F) ATGAATTCCACTTTCTCCCGAGACATTC (R) ATGTCGACCCTTTAGCGGGAGCATTAT	613	Czeczulin et al. (1999)
<i>astA</i>	(F) ATGCCATCAACACAGTATATGC (R) GAGTGACGGCTTTGTAGT	110	Mohamed et al. (2007)
<i>pet</i>	(F) GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT (R) CCTCTTGTTTCCACGACATAC	302	Restieri et al. (2007)
<i>pic</i>	(F) TTCAGCGGAAAGACGAA (R) TCTGCGCATTTCATACCA	500	Piva et al. (2003)
<i>aap</i>	(F) GGACCCGTCCCAATGTATAACCATTC (R) GGTTAGAGCACGAT	250	Boisen et al. (2012)
<i>aggA</i>	(F) TCTATCTRGGGGGGCTAACGCTA (R) CCTGTTCCCCATAACAGACC	220	Boisen et al. (2012)
<i>aafA</i>	(F) CTACTTTATTATCAAGTGGAGCCGC (R) TAGGAGAGGCCAGAGTGAATCCTG	289	Boisen et al. (2012)
<i>agg3A</i>	(F) CCAGTTATTACAGGGTAACAAGGGA (R) ATTGGTCTGGAATAACAACCTGAACG	370	Boisen et al. (2012)
<i>agg4A</i>	(F) TGAGTTGTGGGGCTAYCTGGACACC (R) ATAAGCCGCCAAATAAGC	169	Boisen et al. (2012)
<i>arpA</i>	(F) AACGCTATTCGCCAGCTTGC (R) TCTCCCATACCGTACGCTA	400	Clermont et al. (2013)
<i>chuA</i>	(F) ATGGTACCGGACGAACCAAC (R) TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	Clermont et al. (2013)
<i>yjaA</i>	(F) CAAACGTGAAGTGTCAGGAG (R) AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	Clermont et al. (2013)
TspE4. C2	(F) CACTATTCGTAAGGTCATCC (R) AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC	152	Clermont et al. (2013)

Tabela .2 - Características genóticas e fenotípicas de EAEC isoladas de carne moída na cidade de Londrina.

Local de coleta	Isolado	Perfil genotípico ^a	Perfil de Resistência aos	Ade são	Biofi lme	Filog enia	Serot ipo
A	1	<i>aggR, aatA, astA, aggA</i>	AMP	AA	+	E	O93:
B	2	<i>aggR, aatA, astA, aggA</i>	-	AA	+	E	O93:
K	3	<i>aggR, aatA, aaiC, aaiA,</i> <i>actA shf aggA</i>	-	AA	+	A	H9 O3:H
L	4	<i>aggR, aatA, aaiC, aaiA,</i> <i>actA shf aggA</i>	-	AA	+	A	O3:H
M	5	<i>aggR, aatA, aaiC, aaiA,</i> <i>actA shf aggA</i>	SXT	AA	+	A	O3:H
E	6	<i>actA shf aggA</i> <i>aaiC</i>	-	AA	+	E	O140
P	7	<i>aaiA, astA</i>	SXT	AA	+	B1	O152
N	8	<i>aaiA, astA</i>	AMP	AA	+	B1	O175
L	9	<i>aaiA</i>	AMP	AA	+	B1	ONT:
R	10	<i>aaiA, astA</i>	AMP	AA	+	B1	ONT:
S	11	<i>aaiA</i>	-	AA	+	A	O93:
P	12	<i>aaiA</i>	AMP	AA	+	B1	ONT:
A	13	<i>aaiC</i>	AMP	AA	+	B1	O113
P	14	<i>aaiC, astA</i>	-	AA	+	B1	O70:

^a Genes pesquisados: *aatA, aggR, aaiA, aaiC, shf, astA, pet, pic, aap, aggA, aafA, agg3A, agg4A, arpA, chuA, yjaA, TspE4.C2*; ^b Antibióticos pesquisados: ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina-tazobactam (110 µg), Ampicilina-sulbactam (20 µg) e sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg); AMP, ampicilina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim; AA, adesão agregativa; ONT, antígeno O não tipável,