

Ângela Maria Gonçalves Rodrigues

Patogénese das Infeções Entéricas por *Escherichia coli*



**Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde**

Porto, outubro de 2014.

Ângela Maria Gonçalves Rodrigues

Patogénese das Infecções Entéricas por *Escherichia coli*

**Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde**

Título da dissertação: Patogénese das Infeções Entéricas por *Escherichia coli*

Nome da autora: Ângela Maria Gonçalves Rodrigues

Número da aluna: 21891

Curso: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Docente orientador: Prof. Dr. João Carlos Sousa

Assinatura da aluna:

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

SUMÁRIO

As estirpes de *E. coli* podem ser agrupadas em estirpes comensais, patogênicos extraintestinais e patogênicos intestinais. É um relevante patógeno intestinal que causa infecções entéricas com grandes taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. O desenvolvimento da infecção depende da dose infecciosa ingerida pelo indivíduo, da sua susceptibilidade à doença, da interação entre o patógeno e os enterócitos e virulência do patógeno. *E. coli* induz diarreia através de diversos mecanismos, entre os quais a produção de adesinas, produção de toxinas, indução de alterações celulares nas células do hospedeiro e invasão da mucosa intestinal. As estirpes diarreioagênicas foram agrupadas em seis principais categorias, baseadas nos seus factores de virulência e mecanismos através dos quais provocam doença: *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* enterotoxicogênicas (ETEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC). As EPEC são caracterizadas pela formação de lesões histopatológicas nos enterócitos com posterior secreção de proteínas que causam alterações celulares. As EHEC têm um mecanismo semelhante, além disso, produzem toxinas Shiga, responsáveis por casos severos como diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica (HC), síndrome hemolítico-urémico (HUS) e púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). Quanto a estirpes de ETEC, podem produzir e libertar duas toxinas diferentes: LT e ST, que causam o desequilíbrio da homeostase intestinal por aumento do AMPc e GMPc, respetivamente. EAEC formam um biofilme e libertam toxinas como EAST1 e Pet que estimulam a secreção de fluídos e eletrólitos. EIEC são capazes de invadir enterócitos e replicarem-se. Em relação às DAEC, a infecção é caracterizada pelo crescimento de projeções em forma de “dedo” da superfície dos enterócitos. Para reduzir as taxas de morbidade e de mortalidade, ter acesso a informação sobre as infecções entéricas causadas por *E. coli* e aplicar a prevenção primária são essenciais.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, infecção entérica, mecanismos de patogenicidade, factores de virulência, diarreia, desequilíbrio eletrolítico, prevenção.

ABSTRACT

Escherichia coli (*E. coli*) strains can be grouped as commensal strains, extraintestinal pathogens and intestinal pathogens. It is a relevant intestinal pathogen which causes enteric infections with high morbidity and mortality rates around the world. The development of the infection depends on the infectious dose ingested by an individual, his susceptibility to the disease, enterocytes and pathogens interaction and pathogen's virulence. *E. coli* induces diarrhea through several mechanisms, among them are production of adhesins, production of toxins, induction of cellular alterations in host cells and invasion of intestinal mucosa. Diarrheagenic strains were grouped into six main categories, based on their virulence factors and mechanisms by which they provoke disease: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC). EPEC are characterized by the formation of histopathological lesions in the enterocytes with posterior secretion of proteins that cause cellular alterations. EHEC have a similar mechanism, besides, they produce Shiga toxins, responsible for severe cases as bloody diarrhea, hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). As for ETEC strains, they can produce and release two different toxins: LT and ST, which cause intestinal homeostatic disequilibrium by increasing AMPc and GMPc levels, respectively. EAEC form a biofilm and release toxins as EAST1 and Pet that stimulate fluid and electrolyte secretion. EIEC are capable of invading enterocytes and replicate. Regarding to DAEC strains, the infection is characterized by the growth of finger-like projections of the enterocytes' surface that wrap around the bacteria. To reduce morbidity and mortality rates, having access to information about enteric infections caused by *E. coli* and applying primary prevention are essential.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, enteric infection, mechanisms of pathogenesis, virulence factors, diarrhea, electrolyte imbalance, prevention.

AGRADECIMENTOS

Foram cinco anos de mestrado percorridos com os meus amigos e familiares que me apoiaram, que me deram força, que me alegraram todos os dias. São contribuições indiretas, mas muito importantes, pois é graças a todos eles que acabo mais uma etapa da minha vida.

Agradeço ao Prof. Dr. João Carlos Sousa pela orientação, dedicação, apoio e incentivo. Muito obrigada por toda a disponibilidade e por todas as conversas e partilha de ideias para melhorar este trabalho.

Também agradeço a todos os professores que passaram na minha vida. Em especial, agradeço às professoras Amélia e Conceição da Escola Básica D. Pedro V em Braga, por me terem inculcido um grande prazer pela escrita desde bem cedo. Nestes últimos anos, um muito obrigada à Prof. Dra. Carla Martins Lopes, por me ter acolhido no seu gabinete e por ter tido tanta paciência e dedicação em nos ensinar a todos a trabalhar com as referências bibliográficas e formatação e deu-nos um grande “empurrão” para começar a escrever. E ao Prof. Dr. Ricardo Magalhães, pois são pequenas sugestões que fazem com que um trabalho corra sem problemas!

Agradeço à amiga mais querida do mundo, Luísa Silva. Juntas, é raro o dia sem gargalhadas, tudo fica mais leve, todos os problemas são fáceis de resolver. Unidas desde o primeiro dia de aulas, a nossa amizade foi crescendo até ficar indestrutível. Tenho a certeza que, sem ela, eu não seria tão feliz, não teria tido milhares de momentos inesquecíveis. Que estejas para sempre presente!

Durante estes anos, conheci outras pessoas que foram importantes neste meu percurso académico: Ricardo Martins, Paulo Santos e André Santos. Estão no meu coração, pela vossa amizade, pela vossa sinceridade, por todas as conversas, por haver sempre alguma razão para festejar, por tudo o que vivemos! Espero que assim continue!

Obrigada aos meus colegas de curso, pelas nossas partilhas de conhecimentos e estudo intensivo, principalmente minutos antes dos testes, por serem divertidos e me fazerem sorrir. Em particular, agradeço à colega e amiga Jacinta Rocha, por ser uma ótima companhia, uma parceira de trabalho inigualável, por sempre me levar a casa sem pedir absolutamente nada em troca, por ser simples e divertida, por ser uma excelente pessoa!

Agradeço vivamente ao Carlos Lima pela sua ajuda, preocupação constante e boa disposição, pelas tardes, noites e madrugadas de estudo (um nos relatórios, outro nas maquetes!), um amigo que poucos têm a sorte de conhecer!

Por fim, agradeço do fundo do meu coração aos meus pais, aos meus irmãos e à minha avó, que foram confrontados com a minha ausência durante estes anos, mas que sempre me receberam com alegria quando eu chegava a casa. E pelo seu incansável apoio e carinho! A vocês dedico este trabalho!

Índice

Introdução	1
I. Microbiota Intestinal Saudável.....	3
II. Interação bactérias-trato intestinal	5
III. <i>Escherichia coli</i>	6
3.1. Transmissão.....	8
3.1. Infecção entérica por <i>E. coli</i> em Portugal.....	9
IV. <i>E. coli</i> enteropatogénica (EPEC)	9
4.1. Etiologia e Sintomas.....	11
4.2. Mecanismo de patogenicidade	11
4.2.1. Aderência localizada.....	13
4.2.2. “Attaching and effacing” (A/E).....	15
4.2.2. Outros mecanismos.....	19
V. <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	21
5.1. Etiologia e Sintomas.....	21
5.2. Mecanismo de patogenicidade	22
5.2.1. Toxinas Shiga.....	23
5.2.2. “Attaching and effacing” (A/E).....	25
5.2.3. Plasmídeo 60 MDa	26
5.2.4. Urease	27
5.2.5. Outros mecanismos.....	27
VI. <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	29
6.1. Etiologia e Sintomas.....	29
6.2. Mecanismo de patogenicidade	29

6.2.1. Fatores de colonização	30
6.2.3. Toxinas termolábeis (LT)	30
6.2.4. Toxinas termoestáveis (ST)	32
6.2.2. Lócus tia e tib	34
VII. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	36
7.1. Etiologia e Sintomas.....	36
7.2. Mecanismo de patogenicidade	36
7.2.1. Aderência agregativa	37
7.2.2. Citotoxinas.....	37
7.2.3. EAST1 e PET.....	38
7.2.4. Outros mecanismos.....	38
VIII. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	39
8.1. Etiologia e Sintomas.....	39
8.2. Mecanismo de patogenicidade	39
8.2.1. Invasividade	40
IX. <i>E. coli</i> de adesão difusa (DAEC)	42
9.1. Etiologia e Sintomas	42
9.2. Mecanismo de patogenicidade.....	42
9.2.1. Adesina fimbrial F1845.....	43
9.2.2. AIDA-I.....	44
X. Terapia de reidratação oral	45
XI. Prevenção.....	46
Considerações Finais.....	48
Bibliografia	49

Índice de Figuras

Figura 1. Algumas bactérias do trato digestivo.....	3
Figura 2. Representação esquemática dos fenómenos de infeção pelas <i>E. coli</i> diarreiogénicas em estudos <i>in vitro</i>	7
Figura 3. Ciclo de transmissão de <i>E. coli</i>	8
Figura 4. <i>E. coli</i> enteropatogénicas intimamente ligadas a células epiteliais humanas através de pedestais ricos em filamentos de actina-F (microscopia eletrónica de varrimento).....	12
Figura 5. Esquema simples do mecanismo de <i>E. coli</i> enteropatogénica.....	12
Figura 6. BFP expressos por uma estirpe de EPEC, E2348/69 (microscopia eletrónica).....	13
Figura 7. <i>Twitching motility</i>	14
Figura 8. Lesões <i>Attaching/Effacing</i> (A/E) no enterócito.....	15
Figura 9. Formação do sistema de secreção do tipo III e secreção de proteínas efetoras.....	17
Figura 10. Sistema de secreção do tipo III (SST3).....	18
Figura 11. Estrutura da toxina Shiga.....	24
Figura 12. Esquema simples do mecanismo de ação das toxinas Shiga.....	24
Figura 13. <i>E. coli</i> sob um pedestal de filamentos de actina-F (microscopia eletrónica de varrimento).....	25
Figura 14. Exemplos de fatores de colonização em ETEC.....	30
Figura 15. Mecanismos de ação das toxinas LT e STa.....	32
Figura 16. Aumento do AMPc e do GMPc pelas toxinas LT e STa, respetivamente....	34

Figura 17. Mecanismo de invasão das EIEC.....	41
Figura 18. Projeções em forma de “dedo” e microvilosidades alongadas na infecção por DAEC.....	43

Índice de Quadros e Gráficos

Quadro 1. Número de casos confirmados de infeção entérica, entre 2002 e 2012, pelos principais patótipos de *E. coli* em Portugal.....9

Gráfico 1. Percentagem total do número de casos de infeção por *E. coli* em Portugal entre os anos 2002 e 2012.....10

Lista de Abreviaturas

AAF	Fímbrias de aderência agregativa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
A/E	<i>Attaching and effacing</i>
AEEC	<i>Attaching and effacing Escherichia coli</i>
AIDA	Adesina envolvida na aderência difusa
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BFP	<i>Bundle-forming pilus</i>
Ca²⁺	Ião cálcio
CDEC	<i>Cell-detaching Escherichia coli</i>
CFA	Antigénios dos fatores de colonização
CFTR	Regulador de condutância transmembranar da fibrose cística
CNF	Fator necrosante citotóxico
CO₂	Dióxido de carbono
CS	Antigénios de superfície de coli
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adesão difusa
DAF	<i>Decay-accelerating factor</i>

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAF	Fator de aderência de EPEC
EAST	Toxina termoestável enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
Esp	<i>EPEC secreted proteins</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
F1845	Adesina fimbrial 1845
G_{Sα}	Subunidade α da proteína de ligação ao GTP
Gb₃	Globotriosilceramida
Gb₄	Globotetraosilceramida
GC-C	Guanilato ciclase C
GMPC	Monofosfato de guanosina cíclico
HC	Colite hemorrágica
HUS	Síndrome hemolítico-urémico
IL	Interleucina
IFN-γ	Interferão gama
Ipa	Antígenos plasmidiais de invasão
kDa	Kilodalton

LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
LT	Toxina termolábil
Map	<i>Mitochondrial-associated protein</i>
MDa	Megadalton
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NH₄	Amónia
NTEC	<i>Escherichia coli</i> necrotoxicogénica
PCF	Possíveis fatores de colonização
PET	<i>Plasmid-encoded toxin</i>
PGE₂	Prostaglandina E2
pH	Potencial de hidrogénio
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase C
RDEC-1	<i>Rabbit diarrheagenic Escherichia coli-1</i>
SNC	Sistema nervoso central
SST3	Sistema de secreção do tipo III
ST	Toxina termoestável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i>

UFC	Unidade formadora de colónias
VTEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de verocitotoxina
µm	Micrómetro

Introdução

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por bacilos Gram negativo, asporogénicos, maioritariamente com flagelos peritricos, podem ser aeróbios ou anaeróbios, móveis ou imóveis, sendo identificados pela fermentação de glucose, produção de catalase e ausência de citocromo-oxidase. Encontram-se entre os principais causadores das infeções entéricas, doença que revela uma grande taxa de mortalidade e morbidade, sendo de extrema importância a sua identificação rápida e eficaz.

Quanto a infeções entéricas causadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, encontram-se a *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* e *Escherichia coli*, por exemplo (Sousa, 2000). Mas também existem outros agentes patogénicos, tais como: *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringens* e *C. difficile* e *Bacillus cereus* (Paiva e Kotze, 2003).

Neste trabalho, irá ser focada *Escherichia coli*. Este tema foi escolhido devido à constante importância desta espécie, principalmente nos últimos anos, em que as resistências antimicrobianas têm crescido bastante na Europa. Em 2011, na Alemanha, ocorreu um grande surto, aumentando as taxas confirmadas de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) para mais do dobro, como se pode observar no relatório europeu do “EARS-net” de 2011 e no relatório europeu anual epidemiológico de 2013 (Fraser *et al.*, 2013; Högberg e Heuer, 2011).

Esta bactéria é o microrganismo comensal mais prevalente da microflora intestinal saudável de humanos e animais de sangue quente. Porém, também é conhecida por ser altamente versátil e, por vezes, um agente patogénico mortal. As estirpes de *E. coli* patogénicas atuam através de fatores de virulência e afetam processos celulares no organismo hospedeiro (Kaper *et al.*, 2004).

Este trabalho permite o alargamento do conhecimento em relação aos vários mecanismos de ação e fatores de virulência de *E. coli*, cujas estirpes são bastante heterogéneas, havendo dificuldade em agrupar todos os tipos de *E. coli* diarreiogénicas existentes. Adicionalmente, a partir desta dissertação, conhecem-se os modos de

prevenção para evitar surtos e casos esporádicos de infecções entéricas por *E. coli*, bem como outras consequências da infecção.

Metodologia: na elaboração desta dissertação recorreu-se a uma pesquisa bibliográfica usando como motores de busca o ASM (American Society for Microbiology), BioMed Central, Web of Science e NCBI (National Center for Biotechnology Information). Como organizador de citações e bibliografia foi utilizado o programa EndNote. A seleção dos artigos iniciou-se primeiramente pelo título do artigo, pela leitura do resumo e, por fim, pela leitura completa do artigo.

I. Microbiota Intestinal Saudável

A microflora ou flora intestinal, mais corretamente designada por microbiota, é a comunidade de microrganismos entéricos, incluindo fungos, bactérias, vírus e protozoários (Bedani e Rossi, 2009). Esta é importante para a manutenção da homeostasia intestinal no hospedeiro (Round, 2013).

Nos seres humanos e outros mamíferos, a microbiota intestinal é predominantemente composta por bactérias (na sua maioria anaeróbias estritas), sendo dez vezes mais numerosas que as células do seu hospedeiro (Zoetendal *et al.*, 2004). Podem ser encontradas mais de 400 espécies diferentes de bactérias no intestino (**Figura 1**), sendo 97% anaeróbias estritas, pertencentes aos Géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus*. Entre as bactérias anaeróbias, que compõem cerca de 3% da população bacteriana do intestino, encontram-se as bactérias Gram positivo – *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* – e as Gram negativo, destacando-se *Klebsiella* e *E. coli* (Bedani e Rossi, 2009; Guerreiro *et al.*, 2010). Na flora intestinal estão presentes cerca de 10^6 - 10^7 UFC/g de *E. coli* (Forsythe, 2002a).

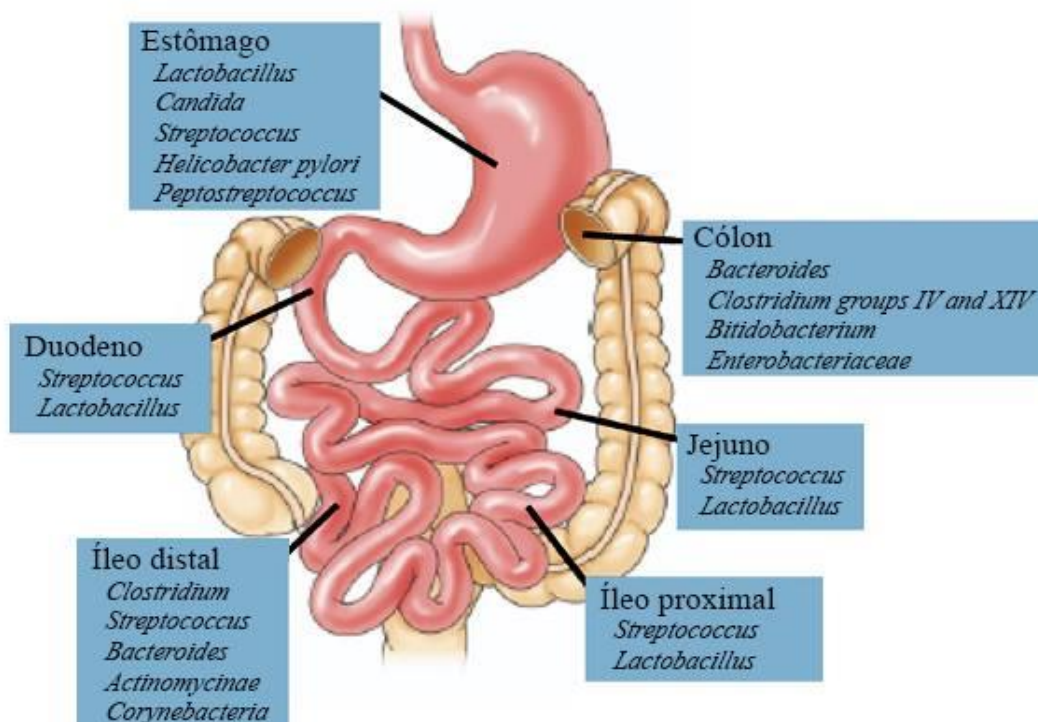


Figura 1. Algumas bactérias do trato digestivo. Adaptado, com modificações (Sartor e Mazmanian, 2012).

As estirpes comensais de *E. coli* colonizam o trato gastrointestinal das crianças nas primeiras horas de vida (Nataro e Kaper, 1998) através da flora vaginal e fecal da mãe e através do meio ambiente. Este último é essencial em bebês nascidos por cesariana (Forssten *et al.*, 2011).

Contudo, apesar de *E. coli* ser uma bactéria comensal do intestino e normalmente inofensiva, as estirpes não patogénicas também podem causar infeções, nomeadamente quando as barreiras gastrointestinais se encontram comprometidas ou quando o sujeito está debilitado ou imunodeprimido.

Além das estirpes não patogénicas de *E. coli*, existem estirpes patogénicas para o homem, capazes de causar sépsis, meningite neonatal, infeções urinárias e infeções entéricas (Kaper *et al.*, 2004).

II. Interação bactérias-trato intestinal

O controlo dos patogénios no intestino é conseguido através de uma camada impenetrável de muco, que aumenta a sua espessura através da reabsorção intensa de água através do epitélio, evitando a invasão de alguns patogénios. Antes das bactérias ou toxinas aderirem e penetrarem a mucosa, têm primeiro de atravessar esta barreira, ou serão excretadas, juntamente com o muco e outros líquidos que banham a superfície da mucosa.

No caso das bactérias conseguirem atravessar o muco e aderir às células epiteliais, o sistema de defesa do organismo tem como papel eliminar as bactérias do muco, através de um processo inflamatório (Brooks e Carroll, 2011; Round, 2013). Após alguns dias/semanas, o sistema imunitário começa a produzir imunoglobulinas secretoras, que podem neutralizar toxinas, assim como bloquear a interação patogénio-enterócito, especialmente a imunoglobulina A secretora (SIgA), a imunoglobulina mais importante em casos de infeções entéricas (Abbas et al., 2008; Berg, 1983; Brooks e Carroll, 2011; Lu e Walker, 2001).

Assim que a aderência do patogénio é bem sucedida, formam-se microcolónias e segue-se o restante desenvolvimento da infeção entérica (Brooks e Carroll, 2011).

As bactérias possuem adesinas que permitem uma aderência específica com os recetores dos enterócitos (Lu e Walker, 2001). As fímbrias podem regular a fixação das bactérias às células, como por exemplo em estirpes diarreiogénicas de *E. coli*, que diferem nos mecanismos de aderência e tipos de fímbrias (Brooks e Carroll, 2011).

III. *Escherichia coli*

Escherichia coli, também denominada de colibacilo (Sousa, 2000), foi descrita pela primeira vez pelo Dr. Theodor Escherich em 1885, sendo originalmente denominada *Bacterium coli commune*. Esta é a bactéria anaeróbia facultativa mais comum na microflora intestinal do homem e de outros animais de sangue quente (Doyle e Padhye, 1989). Quando a sua presença é detetada na água, revela, portanto, uma contaminação fecal recente (Doyle e Padhye, 1989; Sousa, 2000), não devendo ser consumida (Reilly, 1998). *E. coli* continua a ser o indicador de poluição fecal mais usado para monitorização da qualidade da água (Forsythe, 2010; Gordon, 2013).

As estirpes patogénicas de *Escherichia coli* podem causar infeções entéricas severas, cujos sintomas primários são o vômito e diarreia (gastroenterite) (Mendes, 2010). As principais categorias de *E. coli* diarreiogénicas são:

- ***E. coli* enterohemorrágica (EHEC), um subgrupo das *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC);**
- ***E. coli* enteropatogénica (EPEC);**
- ***E. coli* enterotoxigénica (ETEC);**
- ***E. coli* enteroagregativa (EAEC);**
- ***E. coli* enteroinvasiva (EIEC);**
- ***E. coli* de adesão difusa (DAEC) (Almeida *et al.*, 2013; Kaper *et al.*, 2004).**

Recentemente, foi descoberta outra categoria designada de *Cell-Detaching E. coli* (CDEC) devido à sua capacidade de descolar células de cultura que se encontram num suporte sólido. As CDEC produzem α -hemolisina, fator necrosante citotóxico CNF-1, fímbrias associadas a pielonefrite e outros fatores de virulência existentes nas outras *E. coli* diarreiogénicas. Além desta categoria, foram descobertas as *E. coli* necrotoxicogénicas (NTEC), que produzem CNF-1, CNF-2 e toxina citoletal distensora (Fratamico e Smith, 2006).

Na **Figura 2**, encontram-se as seis principais categorias de *E. coli* diarréiogénicas e as suas diversas formas de interagir com o enterócito para causar a infeção entérica. Esses mecanismos irão ser explicados posteriormente.

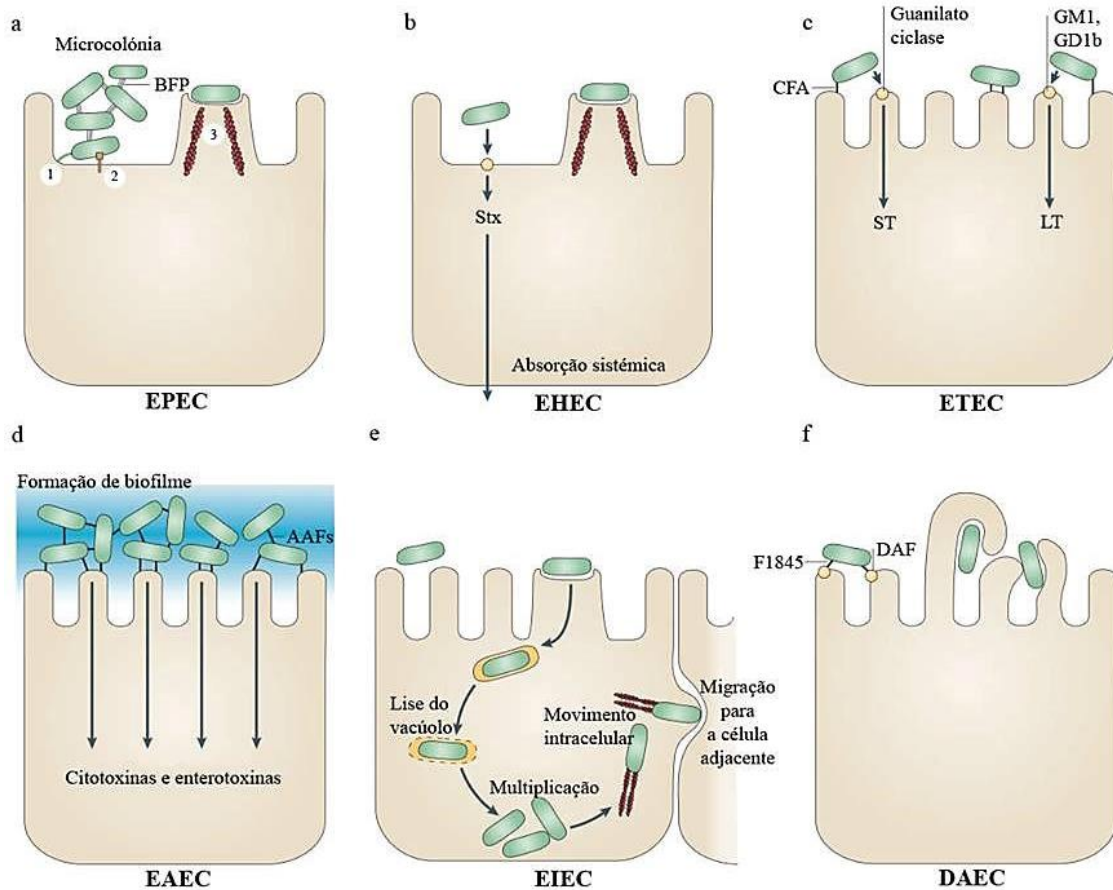


Figura 2. Representação esquemática dos fenómenos de infeção pelas *E. coli* diarréiogénicas em estudos *in vitro*. **A)** As EPEC formam microcolónias graças aos BFP e aderem aos enterócitos (1), secretam proteínas para o interior das células pelo sistema de secreção do tipo III (2), destroem as microvilosidades e formam pedestais, havendo uma aderência íntima com o enterócito (3). **B)** Além de também terem a capacidade de construir pedestais, as EHEC segregam toxinas Shiga – a sua absorção sistémica pode causar doenças severas. **C)** ETEC causa diarreia nomeadamente através de toxinas termolábeis e/ou termoestáveis. **D)** As EAEC formam um biofilme e segregam citotoxinas e enterotoxinas para o interior do enterócito. **E)** Nas infeções por EIEC, os enterócitos são invadidos pela bactéria, que lisa o fagossoma e consegue mover-se pelo citoplasma, mover-se através da membrana plasmática basolateral e também invadir células adjacentes. **F)** A interação entre o epitélio intestinal e as DAEC causa a formação de projeções celulares com forma de “dedo”, que envolvem e protegem as bactérias. AAF, fímbrias de aderência agregativa; BFP, *bundle-forming pilus*; CFA, antígenos dos fatores de colonização; DAF, *decay-accelerating factor*; LT, enterotoxina termolábil; ST, enterotoxina termoestável. Adaptado, com modificações (Kaper et al., 2004).

3.1. Transmissão

A infecção entérica por *E. coli* é normalmente adquirida por ingestão de água ou alimentos contaminados, contacto direto (por transmissão fecal-oral) com pessoas infectadas, com animais infectados ou com o meio ambiente (George, 2011; *National Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) Surveillance Overview*, 2012; Reilly, 1998), incluindo objetos (**Figura 3**) (Nataro e Kaper, 1998).

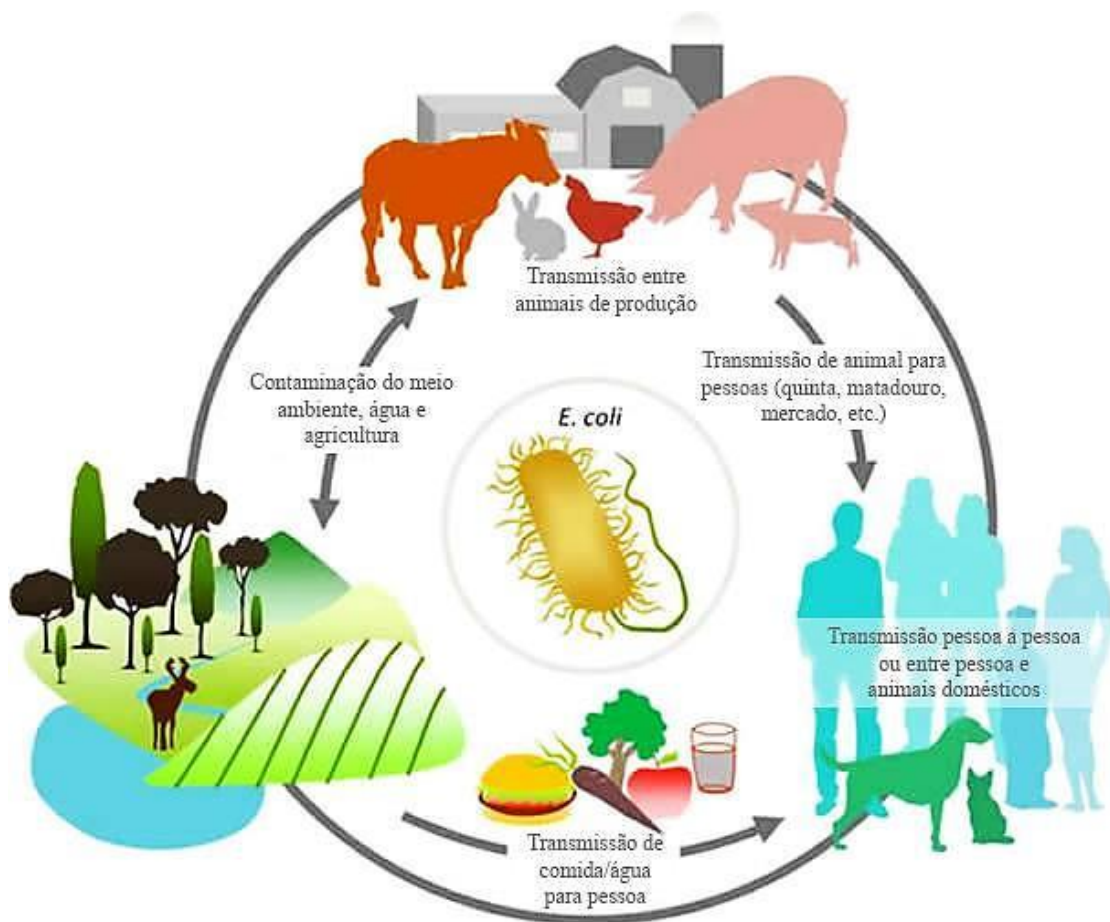


Figura 3. Ciclo de transmissão de *E. coli*. Adaptado, com modificações (*Pathogenic E. coli*, 2004).

Relativamente às doses infecciosas após ingestão, para EIEC e EHEC são necessárias bactérias na ordem das centenas UFC, enquanto que, para EPEC, ETEC e EAEC é preciso uma quantidade bastante maior. Menor ainda é a dose infecciosa de um serótipo

das EHEC, *E. coli* O157:H7, que é de cerca de 10 UFC (Almeida *et al.*, 2013; Gordon, 2013)!

3.2. Infecção entérica por *E. coli* em Portugal

Segundo uma análise realizada pelo Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, nos anos 2002 e 2003, a classe de *E. coli* que provocava mais infeções entéricas em Portugal era EAEC, seguida de STEC e ETEC. A partir de 2004, as ETEC começaram a ser o patótipo mais comum, com exceção do ano 2007 em que a maioria das infeções foram causadas por EAEC e STEC (**Quadro 1** e **Gráfico 1**).

A grande frequência das infeções por STEC deve-se à baixa dose infecciosa destas estirpes e à gravidade das doenças que provocam (Silveira *et al.*, 2013).

Quadro 1. Número de casos confirmados de infecção entérica, entre 2002 e 2012, pelos principais patótipos de *E. coli* em Portugal: casos de infeções por ETEC, EPEC, STEC, EAEC e casos onde os fatores de virulência de ETEC e STEC foram detetados simultaneamente. Adaptado (Silveira *et al.*, 2013)

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
Patótipos	Número de resultados positivos											Total
ETEC	5	7	27	27	24	14	25	29	8	6	11	183
EPEC	3	5	2	5	3	5	1	5	1	6	6	42
STEC	6	10	25	14	15	18	20	15	3	6	4	136
EAEC	7	16	13	16	19	19	7	7	4	6	7	121
ETEC/STEC	0	2	0	2	1	3	1	5	0	0	1	15
Total de positivos em cada ano	21	40	67	64	62	59	54	61	16	24	29	497

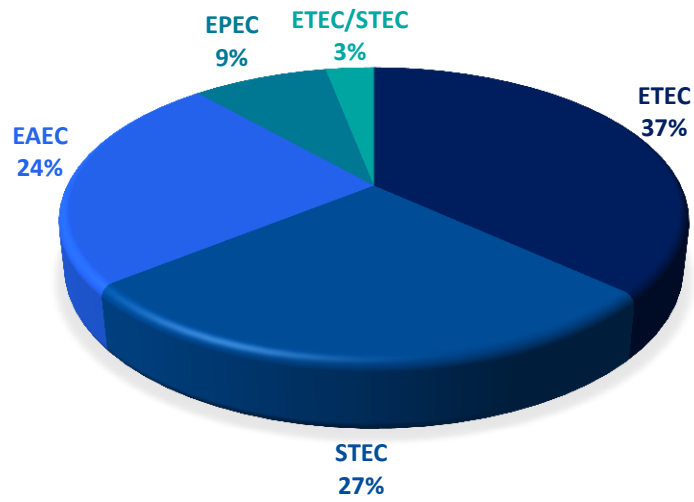


Gráfico 1. Percentagem total do número de casos de infecção por *E. coli* em Portugal entre os anos 2002 e 2012. O maior número de infeções durante estes anos foi provocado por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Silveira *et al.*, 2013).

IV. *E. coli* enteropatogénica (EPEC)

4.1. Etiologia e Sintomas

EPEC foi a primeira categoria de *E. coli* a ser associada a diarreia, num surto que ocorreu numa enfermagem pediátrica em Londres, em 1945 (Dean, 2009; Rodrigues *et al.*, 2004). Atualmente, os surtos são raros em países desenvolvidos, mas a diarreia associada a EPEC continua a ser das maiores causas de mortalidade infantil em países em desenvolvimento (Yang *et al.*, 2014).

Pensa-se que crianças sintomáticas e assintomáticas e adultos assintomáticos são o reservatório de EPEC. Apesar dos alimentos poderem ser contaminados, nenhum alimento em particular foi indicado como possível reservatório (Nataro e Kaper, 1998).

EPEC é um patogénio do intestino delgado (Dean e Kenny, 2009), normalmente relacionado com diarreia infantil severa, principalmente no primeiro ano de vida (Lin *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). A infeção por EPEC causa diarreia abundante com muco (pode conter leucócitos), febre baixa e vômito (Forsythe, 2002b; Nataro e Kaper, 1998).

Alguns estudos *in vitro* em células HEp-2 (linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma da laringe humano) demonstram que o colostro e leite materno têm um papel de proteção contra infeções causadas por EPEC, inibindo a sua aderência às células intestinais (Nataro e Kaper, 1998).

4.2. Mecanismo de patogenicidade

As EPEC são tradicionalmente caracterizadas pela presença da ilha de patogenicidade *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) e ausência de genes *stx*, que codificam as toxinas Shiga (Sahl *et al.*, 2013).

O seu mecanismo de patogenicidade induz a perda de microvilosidades, formação de pedestais (**Figura 4**), inibição do transporte de eletrólitos e de água nos enterócitos, disfunção mitocondrial, rutura das zonas de oclusão celulares (acontece mais tarde,

durante a infeção) e diarreia rápida com alguma resposta inflamatória (**Figura 5**) (Dean e Kenny, 2009).

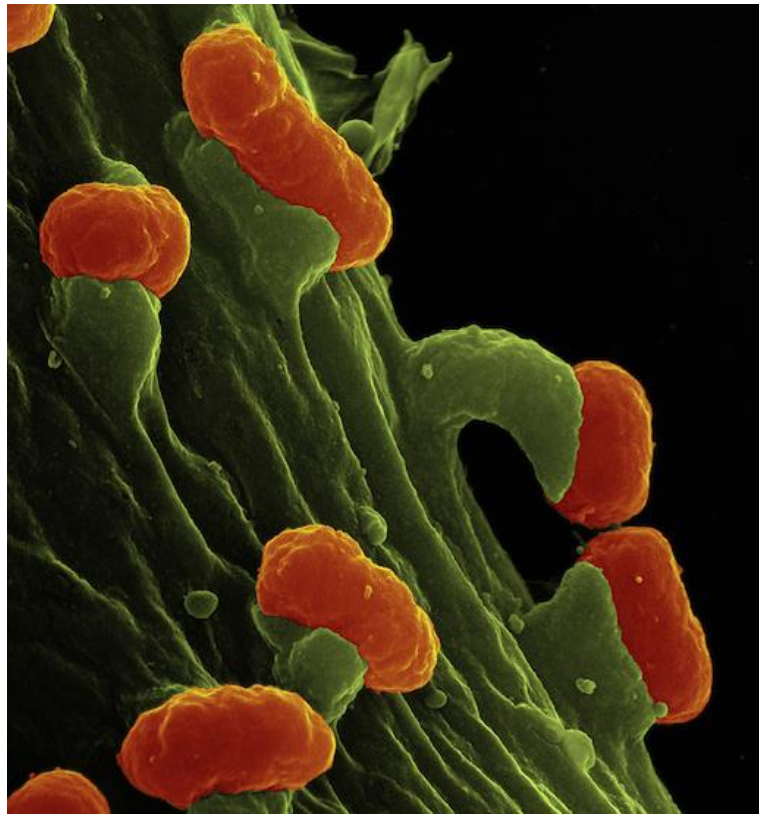


Figura 4. *E. coli* enteropatogénicas intimamente ligadas a células epiteliais humanas através de pedestais ricos em filamentos de actina-F (microscopia eletrónica de varrimento) (Brinkmann, 2010).

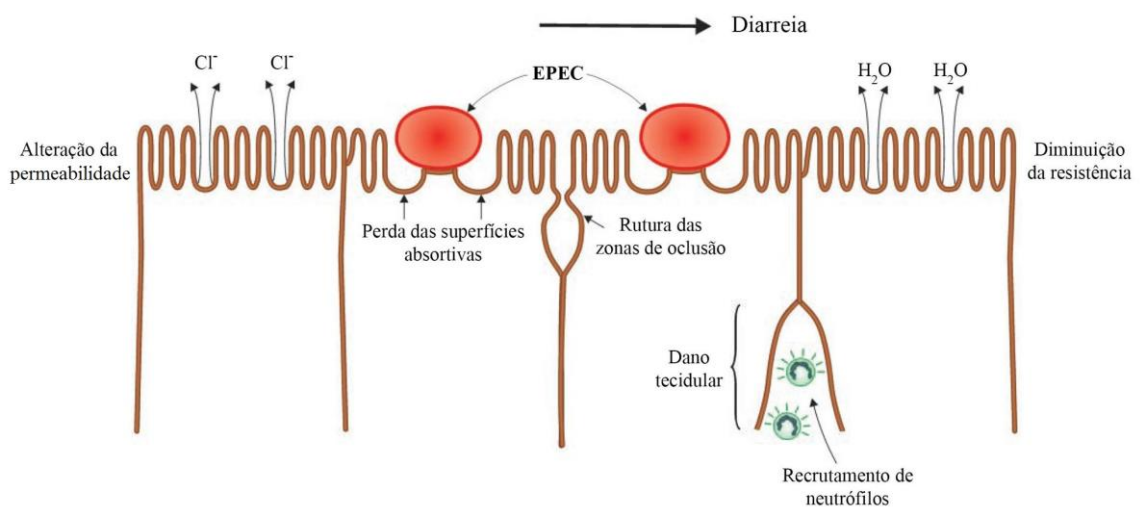


Figura 5. Esquema simples do mecanismo de *E. coli* enteropatogénica. Adaptado, com modificações (Vallance e Finlay, 2000).

Existe um modelo de três etapas para a patogênese das EPEC (não necessariamente sequenciais) e resume-se a: aderência localizada, transdução de sinal e aderência íntima. A primeira etapa caracteriza-se por uma interação distante com os enterócitos e formação de microcolônias localizadas; a segunda, pela ativação de vários genes (como o gene que codifica a intimina – o *eae*) e ocorrência de uma cascata de sinais que levam à dissolução das microvilosidades; e a terceira, pela interação da intimina com o seu recetor Tir (*translocated intimin receptor*) e acumulação de componentes do citoesqueleto da célula, causando a aderência íntima da bactéria com o enterócito (Nataro e Kaper, 1998; Silva e Silva, 2005).

4.2.1. Aderência localizada

O plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor* ou factor de aderência de EPEC), de cerca de 50 a 70 MDa, codifica os genes necessários para expressão e formação das fímbrias do tipo IV chamadas de *bundle-forming pilus* (BFP), importantes para a autoagregação, aderência localizada e dispersão das EPEC (**Figura 6**).



Figura 6. BFP expressos por uma estirpe de EPEC, E2348/69 (microscopia eletrônica). Medida: 0,35 μ m (Nataro e Kaper, 1998).

Os BFP permitem a formação de uma malha de filamentos entre as EPEC, gerando microcolónias; servem de recetores para bacteriófagos e permitem um tipo de translocação das bactérias designado de *twitching motility* (**Figura 7**). Este fenótipo não é essencial para conferir virulência às EPEC, mas a sua presença aumenta a patogenicidade. A expressão de BFP é intensificada com o crescimento exponencial da bactéria à temperatura de 37°C, com a presença de Ca²⁺ (Anantha *et al.*, 2000; Nataro e Kaper, 1998; Sahl *et al.*, 2013; Silva e Silva, 2005).

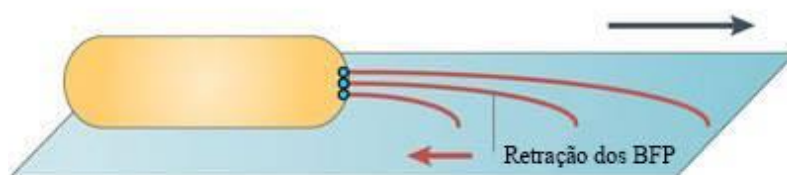


Figura 7. *Twitching motility*: os BFP são retraídos, permitindo a deslocação da bactéria ao longo de uma superfície (Kearns, 2010).

Estas fímbrias distinguem as EPEC típicas das EPEC atípicas: as típicas possuem o plasmídeo EAF e expressam BFP, enquanto que as atípicas não possuem EAF, sendo BFP-negativas. Por outras palavras, as EPEC típicas possuem BFP, ao contrário das EPEC atípicas.

Em países industrializados, as EPEC atípicas são mais isoladas em casos de diarreia do que as EPEC típicas. No entanto, as EPEC típicas são mais comuns em países em desenvolvimento (Kaper *et al.*, 2004).

Estudos com EPEC típicas mostraram que a eliminação da BfpA (bundlina), a principal subunidade de BFP, leva a que os sinais que levam à apoptose cessem, sugerindo um papel importante dos BFP em relação à apoptose celular (Silva e Silva, 2005).

A expressão destas fímbrias requer um gene de regulação da patogenicidade, denominado Per (ou BfpTWV) (Nataro e Kaper, 1998).

4.2.2. “Attaching and effacing” (A/E)

As ilhas de patogenicidade, presentes em *E. coli*, são grandes segmentos de ADN que codificam fatores de virulência, como também os conjuntos de moléculas que auxiliam o encontro deles com as células do hospedeiro (exemplo: sistemas de secreção).

As *E. coli* do tipo *Attaching and Effacing* (AEEC) são um grupo específico de *Escherichia coli*, constituído pelas *E. coli* enteropatogénicas (EPEC) e pelas *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC). As AEEC são caracterizadas pelo facto de possuírem uma ilha de patogenicidade denominada de *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) (Lin *et al.*, 2014; Sahl *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2001) de 35,5 kb (Nataro e Kaper, 1998).

A ilha de patogenicidade LEE permite o mecanismo de patogenicidade característico das AEEC: a habilidade de infringir lesões A/E (*Attaching and Effacing*) nos enterócitos. A denominação *Attaching/Effacing* significa adesão/desaparecimento: adesão da bactéria ao enterócito e desaparecimento das microvilosidades. Mais concretamente, as lesões A/E são lesões histopatológicas caracterizadas pela aderência íntima da bactéria à membrana citoplasmática do enterócito, através da degeneração localizada das microvilosidades do enterócito e do estabelecimento de um pedestal rico em componentes do citoesqueleto da célula hospedeira no local de contacto da bactéria (Figura 8) (Lin *et al.*, 2014; Nataro e Kaper, 1998; Sousa, 2000; Topouzova-Hristova *et al.*, 2012).

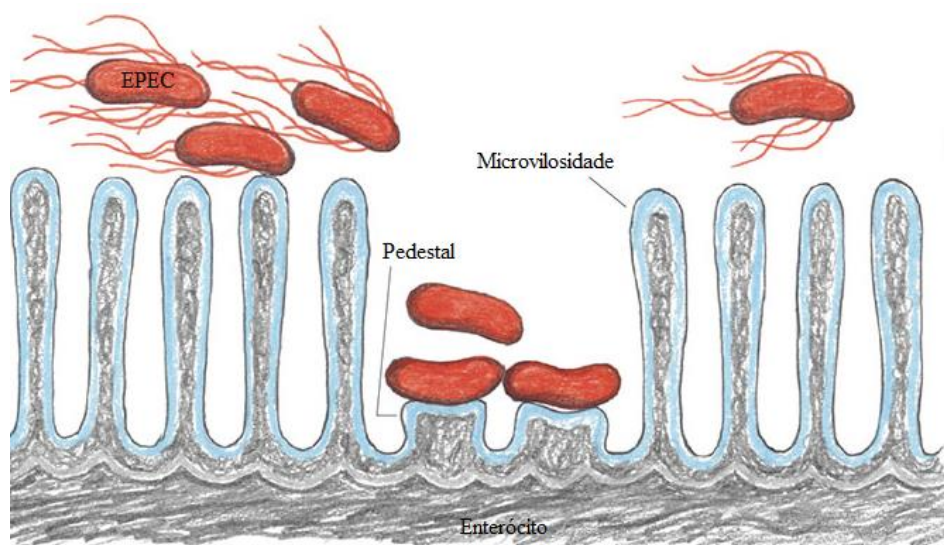


Figura 8. Lesões *Attaching/Effacing* (A/E) no enterócito. Adaptado, com modificações (Blum, 2014).

Além dos filamentos de actina polimerizada (actina-F), outros componentes do citoesqueleto utilizados para formar as lesões A/E são α -actinina, talina, ezrina e a cadeia leve de miosina (Nataro e Kaper, 1998; Silva e Silva, 2005).

McDaniel e Kaper (1997) mostraram que, ao transferir o LEE para uma estirpe não virulenta de *E. coli*, fez com que esta adquirisse o fenótipo A/E, ganhando capacidade de secretar proteínas efetoras e induzir eventos de sinalização no hospedeiro. Também observaram a ausência de microvilosidades nos enterócitos, as quais foram substituídas por pedestais de filamentos de actina, que permitem um contacto íntimo entre a bactéria e a célula alvo. Assim, provaram que o LEE das EPEC era a ilha de patogenicidade responsável por codificar todos os genes envolvidos nas lesões A/E (McDaniel e Kaper, 1997).

A ilha de patogenicidade LEE divide-se em 5 operões principais: LEE1 a LEE5 (Gyles, 2007). As principais substâncias que codifica são: as proteínas translocadoras da família Esp (*EPEC secreted proteins*) EspA, EspB, EspD e EspF, que compõem o sistema de secreção do tipo III; proteínas efetoras, tais como o recetor da intimina (Tir), EspG, EspH, EspZ, e Map (*Mitochondrial-associated protein*); translocadores; chaperones moleculares (proteínas Ces); intimina (Dean e Kenny, 2009; Kenny e Warawa, 2001; Silva e Silva, 2005) e regulador codificado por LEE (Ler), que regula a expressão dos genes produzidos pelo LEE (Zhu *et al.*, 2007) e dos genes produzidos por outras ilhas de patogenicidade, como o gene *espC* (Zhu *et al.*, 2006).

Além do sistema de secreção do tipo III, as EPEC também possuem um sistema de secreção do tipo II e do tipo V, que inclui a enterotoxina EspC (Dean e Kenny, 2009) (o gene *espC* não se encontra no LEE, pelo que uma mutação neste gene não causa alterações nos mecanismos de patogenicidade de EPEC) (Nataro e Kaper, 1998). Porém, irá ser focado o sistema de secreção do tipo III (SST3) por ser o sistema de secreção mais importante na patogénese.

O sistema de secreção do tipo III (SST3) é um organelo com forma de seringa/agulha, utilizado pela bactéria para injetar fatores de virulência no enterócito (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2007). As proteínas efetoras secretadas por EPEC podem ser codificadas pelo LEE ou por outras ilhas de patogenicidade (Zhu *et al.*, 2006). Uma vez no interior da célula, as proteínas efetoras interagem com os domínios das proteínas do

hospedeiro, por meio da fosforilação ou transferência de resíduos, que resulta numa cascata de reações que promovem modificações no citoesqueleto, escape de sistema de defesa no interior de fagossomas, morte e outras alterações celulares (Lin *et al.*, 2014; Vieira, 2009).

Para formar esta “agulha”, EPEC secreta EspA, EspB e EspD para o exterior através de um sistema de secreção do tipo III, codificado pelos genes *esc* e *sep*. Assim, é formado um poro na membrana da bactéria que permite a saída das *EPEC secreted proteins* (Esp). Já no exterior, EspA forma um tubo filamentoso e, em seguida, EspB e EspD são transportados para a membrana da célula alvo e formam um poro. O tubo de EspA e o poro formado permitem a translocação de proteínas efetoras, como Tir (receptor da intimina) (**Figura 9**). Uma ATPase designada de EscN também participa na formação da agulha (Silva e Silva, 2005; Vallance e Finlay, 2000).

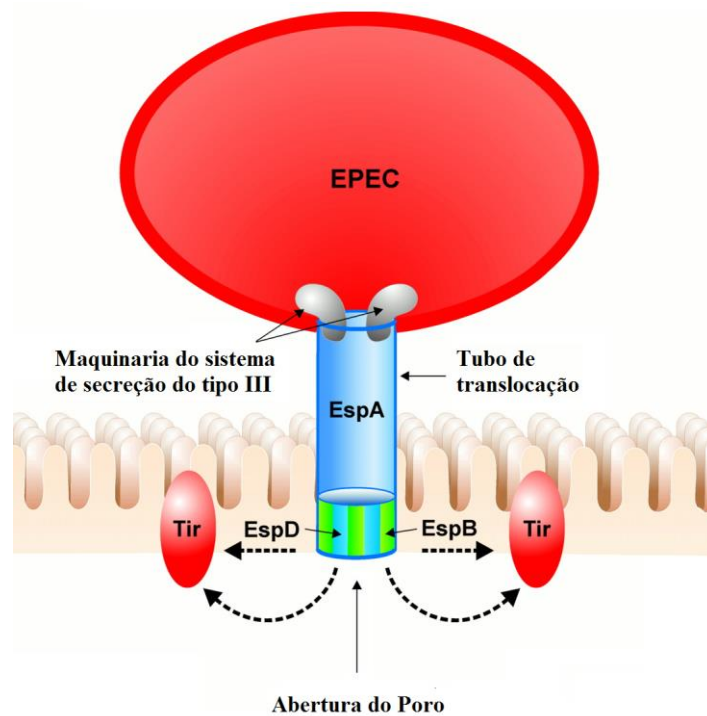


Figura 9. Formação do sistema de secreção do tipo III e secreção de proteínas efetoras. Adaptado, com modificações (Vallance e Finlay, 2000).

A formação do SST3 e a aderência da bactéria ao enterócito são essenciais para a transdução de sinais e formação da lesão A/E. Por isso, não podem ocorrer mutações nos genes que codificam as proteínas EspA (25 kDa), EspB (38 kDa) ou EspD (40

kDa), ou seja, nos genes *espA*, *espB* ou *espD*, ou nos genes que codificam o SST3 (*sep* e *esc*) (Nataro e Kaper, 1998).

Este importante organelo começa desde o citoplasma bacteriano, trespassa as membranas interna e externa até passar a membrana do enterócito ao qual a bactéria se aderiu (**Figura 10**) (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2007).

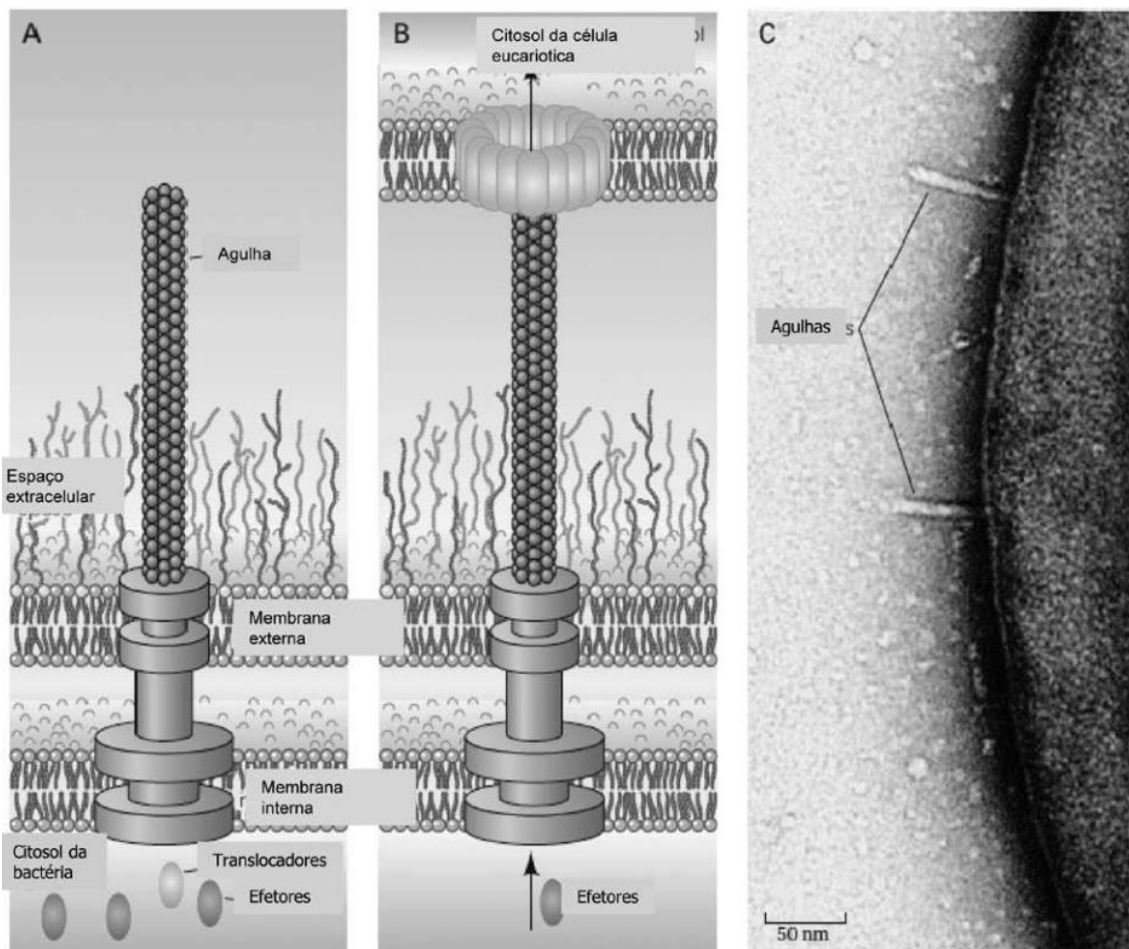


Figura 10. Sistema de secreção do tipo III (SST3). **A)** formam-se dois anéis na membrana da bactéria, de onde se projeta uma “agulha molecular” e as proteínas efetoras e translocadoras são armazenadas para posteriormente serem deslocadas para a célula alvo. **B)** As proteínas translocadas EspB e EspD formam um poro na membrana da célula do hospedeiro para permitir a passagem das proteínas efetoras da bactéria para o citosol da célula. **C)** Bactéria com agulhas do SST3 à sua superfície (microscopia eletrônica) (Lin *et al.*, 2014).

Inicialmente, pensava-se que EPEC se ligava a um recetor presente nas células hospedeiras. Na verdade, EPEC expressa o seu próprio recetor, de 90 kDa – Tir, *Translocated Intimin Receptor* –, que é translocado através da “seringa” do SST3 e é colocado na membrana do enterócito. Nessa altura, é fosforilado por cinases do enterócito, funcionando como recetor de uma adesina de 94 kDa codificada pelo gene *eae* (contido no LEE), designada por intimina (Lin *et al.*, 2014; Sahl *et al.*, 2013; Silva e Silva, 2005; Vallance e Finlay, 2000) ou Eae (Gyles, 2007). A ligação Tir-intimina é necessária para a aderência íntima da bactéria ao enterócito. A fosforilação no resíduo 474 da Tir, juntamente com a interação da Tir com a intimina, é essencial para a condensação de actina-F para formação das lesões A/E em linhas celulares imortalizadas. Porém, em estudos *ex vivo* com biópsias de tecido humano, a fosforilação da tirosina demonstrou ser desnecessária (Dean e Kenny, 2009; Kenny, 1999).

Além do próprio recetor Tir, a intimina pode-se ligar a outros recetores da célula hospedeira, como a nucleolina ou integrinas $\beta 1$ (Rendon *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2005).

Tir e intimina também estão envolvidos no desaparecimento das microvilosidades, juntamente com as proteínas efectoras EspF e Map, e na disrupção das zonas de oclusão das células (Kenny, 1999). Como consequência, proteínas da membrana basolateral do enterócito são redistribuídas para a superfície apical, incluindo integrinas $\beta 1$, havendo assim mais recetores para a intimina, o que aumenta a probabilidade da ligação da bactéria ao enterócito (Torres *et al.*, 2005).

4.2.2. Outros mecanismos

A interação das EPEC com os enterócitos provoca a ativação de várias cascatas de sinalização. Causa o aumento intracelular de cálcio e a ativação de várias cinases: a proteína cinase C (PKC), a cinase da cadeia leve de miosina, fosfolipase C γ e cinase da proteína ativada por mitogénio, que aumentam a permeabilidade das zonas de oclusão e provocam grandes mudanças na secreção de eletrólitos e água (Kaper *et al.*, 2004; Nataro e Kaper, 1998).

Na ligação das bactérias às células intestinais, a flagina FliC (principal componente dos flagelos) é o estimulador dominante da inflamação intestinal. Através da ligação ao recetor Toll-like 5, a FliC ativa o sistema NF- κ B, que aumenta a expressão de IL-8 e outras substâncias quimiotáticas, provocando a migração de leucócitos polimorfonucleares para a monocamada epitelial (Nataro e Kaper, 1998; Schuller *et al.*, 2009; Silva e Silva, 2005). As bactérias podem ativar este sistema, mesmo que a expressão de intimina e as lesões A/E não ocorram (Silva e Silva, 2005).

Em algumas estirpes de EPEC produtoras de lesões A/E foi encontrado o gene *lifA*, responsável pela expressão de linfostatina. Esta toxina inibe a ativação e proliferação de linfócitos e inibe seletivamente a produção de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ . Isto pode facilitar o escape da bactéria ao sistema imunitário do hospedeiro, prolongando a duração da infeção (Fratamico e Smith, 2006).

V. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

5.1. Etiologia e Sintomas

As STEC que contêm a ilha de patogenicidade LEE (*Locus of enterocyte effacement*) são geralmente chamadas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) devido à colite hemorrágica que provocam no hospedeiro (Lin *et al.*, 2014; Sahl *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2001). Apesar de nem todas as estirpes de STEC serem patogênicas, as estirpes de EHEC são bastante patogênicas para o homem. Por esse motivo, este capítulo irá ser mais focado nas EHEC (Nataro e Kaper, 1998).

As STEC são caracterizadas pela produção de citotoxinas que provocam a inibição da síntese proteica em células eucarióticas. Devido a possuírem atividade citotóxica contra células Vero (linhagem contínua de células renais de macaco verde africano), estas citotoxinas foram chamadas de verocitotoxinas. Podem igualmente ser chamadas de toxinas Shiga (Stx), por causa da semelhança com uma citoxina de *Shigella dysenteriae* serótipo 1. Assim sendo, além de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), esta classe também pode ser denominada de *E. coli* produtora de verocitotoxina (VTEC) (Caprioli *et al.*, 2005; Gyles, 2007; Nataro e Kaper, 1998).

As EHEC são usualmente associadas a surtos de origem alimentar (Yang *et al.*, 2014), uma vez que o gado bovino, normalmente saudável, é o maior e o mais importante reservatório deste tipo de *E. coli*, mas também pode ser encontrada noutros animais (Almeida *et al.*, 2013; Bertão e Saridakis, 2007; Caprioli *et al.*, 2005; Nataro e Kaper, 1998).

As infecções por EHEC em humanos são relativamente incomuns, porém podem ter consequências graves, especialmente em idosos e crianças, como colite hemorrágica (HC), síndrome hemolítico-urémico (HUS) e púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)¹ e pode envolver complicações no SNC (Caprioli *et al.*, 2005). Estas bactérias colonizam principalmente o intestino grosso, ao contrário das EPEC (Torres *et al.*, 2005).

¹ Na TTP, as plaquetas sanguíneas envolvem os órgãos internos, causando danos nos rins e no SNC (Forsythe, 2010).

É um importante agente etiológico associado a surtos diarreicos em países desenvolvidos (Yang *et al.*, 2014), como por exemplo a Alemanha onde, em 2011, foram registadas 53 mortes, 833 casos de HUS e aproximadamente 3000 casos de gastroenterite (Prager *et al.*, 2014). Além disso, causa cerca de 73 mil infecções e 60 mortes por ano nos Estados Unidos (Murray *et al.*, 2009).

As doenças causadas por EHEC podem ir de assintomáticas a letais (Almeida *et al.*, 2013). A apresentação clínica da doença envolve gastroenterite aguda, por vezes juntamente com febre, vômitos, dores abdominais e diarreia geralmente sanguinolenta. Normalmente a doença dura de cinco a sete dias, na maior parte das vezes é autolimitada. Também pode evoluir em 25% dos casos e num intervalo de uma semana para HUS, que pode durar até duas semanas. Este síndrome é caracterizado por insuficiência renal aguda e por, pelo menos, um destes critérios: anemia hemolítica microangiopática ou trombocitopenia (George, 2011; Yang *et al.*, 2014). A insuficiência renal pode vir acompanhada de palidez, hematomas e petéquias (Vranjac, 2002).

O principal serótipo responsável pela HC é o O157:H7 (Sousa, 2000). É importante salientar que o nome dos serótipos é baseado no antígeno O e no antígeno H (Almeida *et al.*, 2013). Nos casos mais sérios de HC, a diarreia é sanguinolenta (Forsythe, 2002b). Além disso, pacientes com diarreia sanguinolenta devido a O157:H7 têm mais probabilidade de desenvolver HUS (Nataro e Kaper, 1998). Também existe uma probabilidade de 3% de óbito em casos de HUS e uma probabilidade de 30% de ocorrerem sequelas graves, tais como hipertensão, manifestações no SNC e insuficiência renal (Murray *et al.*, 2009).

5.2. Mecanismo de patogenicidade

Como já foi mencionado, as EHEC são um subgrupo dentro das STEC e têm um significado clínico distinto. Segundo Nataro e Kaper (1998), existem quatro parâmetros que definem as EHEC:

O termo “*E. coli* enterohemorrágica” (EHEC) foi originalmente criado para representar estirpes que causam HC e HUS, expressam Stx, causam lesões A/E em células epiteliais, e possuem um plasmídeo de aproximadamente 60 MDa (Nataro e Kaper, 1998).²

As EHEC são definidas pela produção de toxinas Shiga. Estas são proteínas codificadas por genes *stx* incluídos no genoma de bacteriófagos (*National Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) Surveillance Overview*, 2012; Parreira, 2002) e são o principal factor de virulência das EHEC (Vieira, 2009).

5.2.1. Toxinas Shiga

Stx1 e Stx2 são as duas principais toxinas da família das toxinas Shiga. Uma estirpe pode produzir Stx1, Stx2, as duas ou variantes dessas toxinas. Diferentemente de Stx1, as Stx2 possuem muitas variantes, como por exemplo Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e (Nataro e Kaper, 1998).

O gene *stx2* é um fator de risco para diarreia sanguinolenta e HUS (*National Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) Surveillance Overview*, 2012), pois a Stx2 é capaz de destruir as células endoteliais dos glomérulos – os danos nas células induzem a ativação de plaquetas e, devido à deposição de trombina, a filtração glomerular diminui (Murray *et al.*, 2009). As Stx2 foram associadas apenas a STEC *eae*-negativas (não contêm o gene que codifica a intimina), ou seja, não são encontradas em EHEC (Gyles, 2007).

As toxinas Shiga têm estrutura AB₅, sendo compostas por uma subunidade A, que contém os peptídeos A₁ (28 kDa) e A₂ (4 kDa) ligados por uma ponte dissulfeto e cinco subunidades idênticas B de 7,7 kDa cada uma. O peptídeo A₁ é uma N-glicosidase que possui a atividade enzimática, ao passo que A₂ tem a função de se ligar a uma das subunidades B de forma não covalente (**Figura 11**) (Forsythe, 2002b; Nataro e Kaper, 1998).

² [The term “enterohemorrhagic *E. coli*” (EHEC) was originally coined to denote strains that cause HC and HUS, express Stx, cause A/E lesions on epithelial cells, and possess a ca. 60 MDa plasmid.]

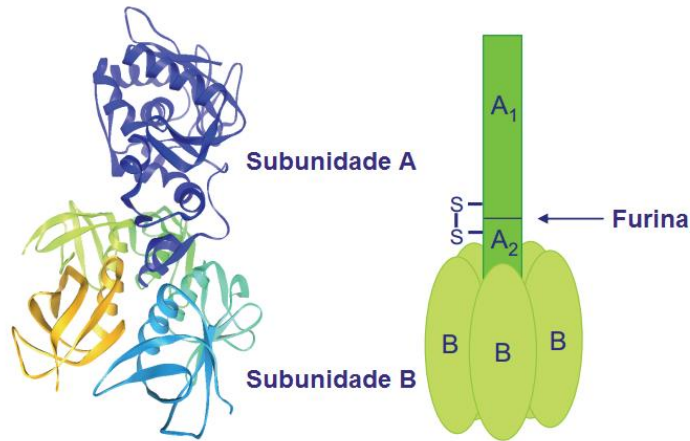


Figura 11. Estrutura da toxina Shiga. Adaptado, com modificações (Torgersen *et al.*, 2010).

Stx liga-se à globotriosilceramida (Gb₃) presente na membrana plasmática de células eucarióticas (Nataro e Kaper, 1998), com exceção da variante Stx2e, que se liga à globotetraosilceramida (Gb₄), podendo ligar-se também à Gb₃. Segue-se a endocitose de Stx: em células sensíveis a Stx, a toxina passa pelo aparelho de Golgi, pelo retículo endoplasmático e, por fim, citosol do enterócito. Depois da subunidade A ser clivada pela enzima furina, A₁ atua na subunidade 60S do ribossoma, inibindo a síntese proteica devido à remoção de um resíduo de adenina da subunidade 28S do RNA ribossomal (**Figura 12**) (Bertão e Saridakis, 2007; Gyles, 2007). A toxina causa a morte a todas as células que contêm o seu recetor, tais como enterócitos e células renais (Nataro e Kaper, 1998)

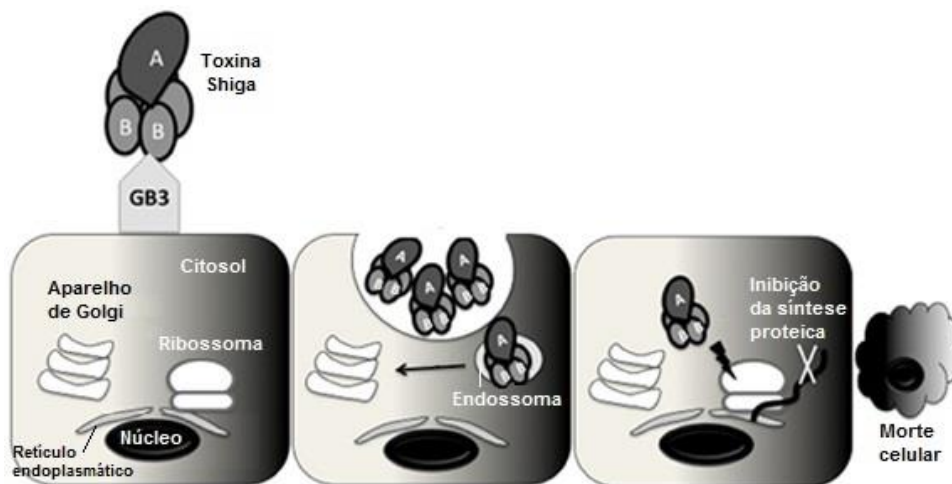


Figura 12. Esquema simples do mecanismo de ação das toxinas Shiga. Adaptado, com modificações (Pacheco e Sperandio, 2012).

As toxinas Shiga estimulam a produção de citocinas inflamatórias, tal como o fator tumoral de necrose (TNF), que induzem a expressão dos recetores Gb₃ à superfície celular (Murray *et al.*, 2009).

Para a ocorrência de diarreia sem sangue são apenas necessárias as lesões A/E. Porém, é a presença de Stx que causa diarreia sanguinolenta e colite hemorrágica (Nataro e Kaper, 1998).

5.2.2. “Attaching and effacing” (A/E)

Como já foi referido, tal como as EPEC, as EHEC possuem a ilha de patogenicidade *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE), produzindo as lesões histopatológicas *Attaching/Effacing* e formando os chamados pedestais (**Figura 13**) (Lin *et al.*, 2014; Vieira, 2009). O LEE das EHEC também codifica os genes que expressam a intimina e substâncias homólogas a EspA, EspB e EspD, que são igualmente secretadas por um sistema de secreção do tipo III (Puente e Finlay, 2001).

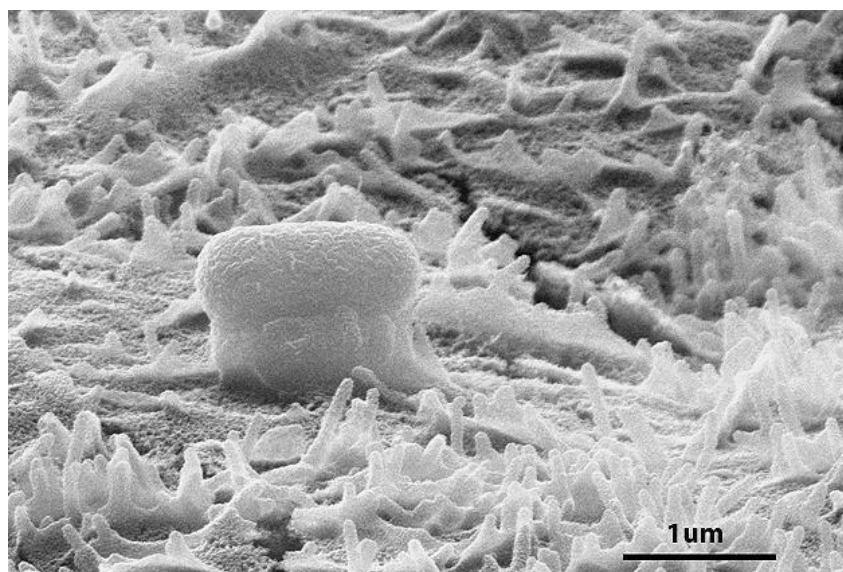


Figura 13. *E. coli* sob um pedestal de filamentos de actina-F (microscopia eletrônica de varrimento) (Buckley, 2012).

Porém, ao contrário do que acontece com a classe EPEC, quando o LEE das EHEC é transferido para bactérias *E. coli* não patogénicas, não são observadas lesões A/E, sugerindo a necessidade da codificação de outros genes fora do LEE para que se formem as lesões A/E (Vieira, 2009).

Diferentemente das EPEC, o Tir (recetor da intimina) das EHEC não possui o resíduo tirosina 474 (com exceção da estirpe EHEC O26 e da estirpe diarreiogénica dos coelhos RDEC-1), estando substituído por serina, por isso, não é fosforilado.

A diarreia por EHEC também é inflamatória: num estudo foram encontrados leucócitos polimorfonucleares nas fezes de cerca de metade dos pacientes com colite hemorrágica (Kenny, 1999).

5.2.3. Plasmídeo 60 MDa

O plasmídeo 60 MDa, também chamado pO157, codifica a enterohemolisina e antígenos fimbriais possivelmente envolvidos na colonização da bactéria, por fornecimento de ferro às EHEC através da lise de eritrócitos (Bertão e Saridakis, 2007; Nataro e Kaper, 1998). Também expressa uma catalase-peroxidase (KatP) e uma serina protease (EspP) que pode clivar o fator V de coagulação no ser humano e agravar a doença hemorrágica.

Comparando as EHEC com as EPEC, as EHEC possuem o fago codificador de Stx e o plasmídeo pO157, enquanto que as EPEC possuem o plasmídeo EAF (codifica as fímbrias BFP, *bundle-forming pilus*). Para além disso, pO157 também é uma característica específica das estirpes do subgrupo EHEC em relação às do grupo STEC (Bertão e Saridakis, 2007; Nataro e Kaper, 1998).

5.2.4. Urease

Algumas estirpes de STEC possuem o grupo de genes *ure*, que codifica a urease e proteínas acessórias. A enzima urease hidrolisa o substrato ureia para formar duas moléculas de NH₄ e uma de CO₂. Não é essencial para a virulência, mas a sua expressão aumenta a patogenicidade. Especificamente, ajuda na sobrevivência da bactéria, em casos de baixo pH, como no estômago e pensa-se que é por isso que a dose infecciosa por via oral de STEC é muito baixa, comparativamente a outras classes de *E. coli*. Além disso, melhora a colonização intestinal, fornecendo azoto à bactéria, que ganha uma vantagem metabólica sobre os microrganismos comensais.

A urease é considerada um importante fator de virulência noutras bactérias, como por exemplo *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica* e *Brucella abortus* (Steyert et al., 2011).

5.2.5. Outros mecanismos

Foram sugeridos outros fatores de virulência das STEC, cuja função requer mais estudos (Bertão e Saridakis, 2007), tais como: adesinas fimbriais (Torres *et al.*, 2005) que auxiliam na formação de microcolónias e na aderência ao epitélio, adesinas não fimbriais e proteínas da membrana externa A (OmpA), que ajudam na aderência; StcE, uma metaloprotease que cliva o inibidor da C1 esterase e auxilia na aderência; e contêm proteases, tais como EspP/PssA, EspI/NleA e KatP, que ajudam a degradar e a clivar algumas substâncias. Em particular, EspP/PssA é citotóxica para as células Vero e cliva a pepsina A e o fator de coagulação V; EspI/NleA degrada a pepsina A e a apolipoproteína A; por fim, KatP é uma catalase/peroxidase de codificação plasmidial.

Além das toxinas Shiga, existem outras toxinas produzidas por algumas estirpes de STEC, como por exemplo a toxina citoletal distensora (Gyles, 2007), que interfere com a regulação do ciclo celular e causa a apoptose celular (Forsythe, 2010; Jinadasa *et al.*, 2011); EAST1 (toxina termoestável 1 de *E. coli* enteroagregativa), que contribui para a

diarreia aquosa; e uma citotoxina potente e letal com estrutura AB₅ chamada de subtilase, homóloga à subtilase de *Bacillus anthracis*.

É importante frisar que a bactéria usa hemoglobina/heme para promover o seu crescimento e proliferação durante a infecção entérica, através de um transporte de ferro especializado. A hemolisina produzida por *E. coli* O157:H7, além de fornecer hemoglobina (contém ferro) proveniente de eritrócitos às bactérias, é citotóxica e induz a produção de citotoxinas pró-inflamatórias (Gyles, 2007; Nataro e Kaper, 1998).

VI. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

6.1. Etiologia e Sintomas

ETEC encontra-se entre as categorias de *E. coli* que causam mais infeções entéricas no mundo. Anualmente, morrem entre 300.000 e 500.000 pessoas em países em desenvolvimento devido a infeções entéricas por ETEC (Sahl *et al.*, 2013).

As ETEC colonizam as proximidades do intestino delgado (Forsythe, 2002b) e são responsáveis pela patogénese da diarreia aguda, nomeadamente em crianças e em pessoas que viajam para zonas endémicas, sendo a principal causa da “diarreia do viajante” (Donnenberg, 2013; Oliveira *et al.*, 2007; Sousa, 2000). Estes grupos são os mais suscetíveis à infeção entérica por não possuírem imunidade adquirida contra as ETEC. No caso dos viajantes, a probabilidade de adquirirem imunidade aumenta com o número de viagens às áreas endémicas (Elsinghorst, 2002).

A doença tem início repentino com um período de incubação de 14 a 50 horas. A doença pode ser moderada e autolimitada (1-3 dias), porém pode causar sintomas severos semelhantes aos da cólera. É uma doença muito séria em recém-nascidos. Produz febre baixa, vômitos são raros e a diarreia tem uma aparência semelhante à água de arroz, é aquosa, normalmente sem sangue, muco ou pus (Forsythe, 2002b; Forsythe, 2010; Nataro e Kaper, 1998) e não é inflamatória.

Foi descoberto que a amamentação no primeiro ano de vida proporciona um efeito protetor contra infeções entéricas severas por ETEC e por outros patogénios.

6.2. Mecanismo de patogenicidade

A infeção é caracterizada pela colonização do intestino delgado com a intervenção de fatores de colonização, com a ulterior produção de enterotoxinas (Oliveira *et al.*, 2007). As estirpes podem produzir apenas enterotoxinas termolábeis (LT), apenas termoestáveis (ST) ou as duas (Sousa, 2000).

6.2.1. Fatores de colonização

Os fatores de colonização humanos, geralmente chamados de adesinas, dividem-se em antígenos dos fatores de colonização (CFA), antígenos de superfície de coli (CS) e possíveis fatores de colonização (PCF) (Torres *et al.*, 2005).

É importante salientar que estas adesinas asseguram a aderência da bactéria às microvilosidades do intestino, permitindo que posteriormente esta liberte toxinas para o interior do enterócito (Sousa, 2000).

As adesinas mais comuns são as CFA/I, fímbrias rígidas em forma de barra (**Figura 14B**); as CFA/III, que são BFP e são homólogas à família fimbrial do tipo IV (**Figura 14A**) (Nataro e Kaper, 1998); as CFA/II e CFA/IV são compostos por distintas estruturas múltiplas de fímbrias – CFA/II é um complexo de CS1, CS2 e CS3 e CFA/IV é um complexo de CS4, CS5 e CS6. Outros fatores usuais incluem CS7, CS17, CS19, CS20, CS22, fímbria longus (CS21), PCFO9, PCFO20, PCFO148, PCFO159, PCFO166, antígeno 2230 e antígeno 8786 (Torres *et al.*, 2005).

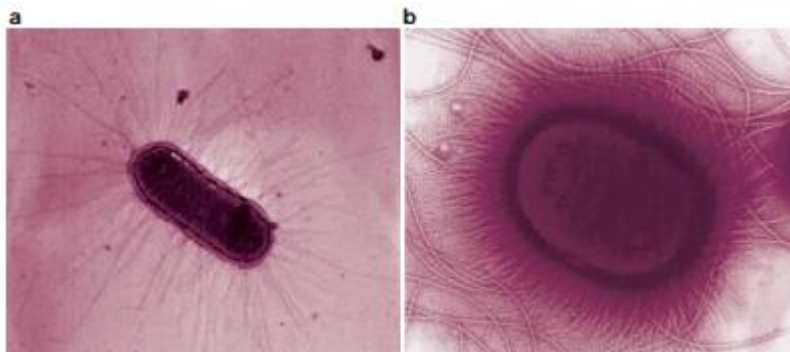


Figura 14. Exemplos de fatores de colonização em ETEC. **A)** Fímbrias CFA/III; **B)** Fímbrias CFA/I e longos flagelos (Kaper *et al.*, 2004).

6.2.3. Toxinas termolábeis (LT)

As toxinas termolábeis são toxinas grandes e oligoméricas e o seu mecanismo de ação é similar ao da toxina colérica, presente em *V. cholerae*, destacando-se algumas

diferenças no que toca ao processamento e secreção da toxina e na resposta das células T-helper (Nataro e Kaper, 1998; Sousa, 2000).

As duas mais importantes são as LT-I e LT-II, sendo a última raramente encontrada em infeções entéricas em humanos. Os genes que codificam as toxinas LT estão presentes em plasmídeos que também contêm outros genes codificadores de toxinas ST e/ou fatores de colonização (Nataro e Kaper, 1998). As toxinas LT-I e LT-II possuem uma subunidade A e cinco subunidades B, isto é, têm uma estrutura AB₅ (Forsythe, 2002a).

Quando as ETEC se aderem aos enterócitos, as toxinas LT-I são secretadas. As 5 subunidades B formam uma estrutura em anel e ligam-se preferencialmente ao monossialogangliosídeo GM1 (também podem ter ligações fracas com o gangliosídeo GD1b), que se encontra à superfície dos enterócitos, ativando a endocitose da holotoxina. Seguidamente, no interior do enterócito, a subunidade A é clivada, formando os domínios A₁ e A₂ ligados por uma ponte dissulfeto que atravessam o centro do anel criado pelas subunidades B. Então, o domínio A₁ viaja até alcançar o aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático. Em seguida, A₁ transfere ADP-ribose de NAD para a G_{Sα} (subunidade α da proteína de ligação ao GTP). A ADP-ribosilação da G_{Sα} provoca a ativação permanente da adenilciclase, que rapidamente converte ATP em AMPc. O aumento dos níveis intracelulares de AMPc leva à ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), causando a fosforilação e abertura dos canais de cloreto, como por exemplo o CFTR (regulador de condutância transmembranar da fibrose cística), à superfície dos enterócitos de uma forma superior ao normal.

Estes eventos alteram a permeabilidade celular da membrana citoplasmática e estimulam a secreção de cloro para o lúmen intestinal e a inibição da absorção de NaCl. Com a saída de eletrólitos, ocorre também a libertação de água por gradiente osmótico, causando, deste modo, a diarreia aquosa (**Figura 15**) (Deshpande, 2002; Flores e Okhuysen, 2010; Forsythe, 2002a; Lima e Fonteles, 2014; Nataro e Kaper, 1998; Sousa, 2000).

Ao contrário da toxina colérica, a toxina LT-I não é excretada, mas sim encontra-se maioritariamente no espaço periplasmático da bactéria e é expulsa quando exposta a ácidos biliares e baixas concentrações de iões, como acontece no intestino delgado (Forsythe, 2002a; Ozaki *et al.*, 2009).

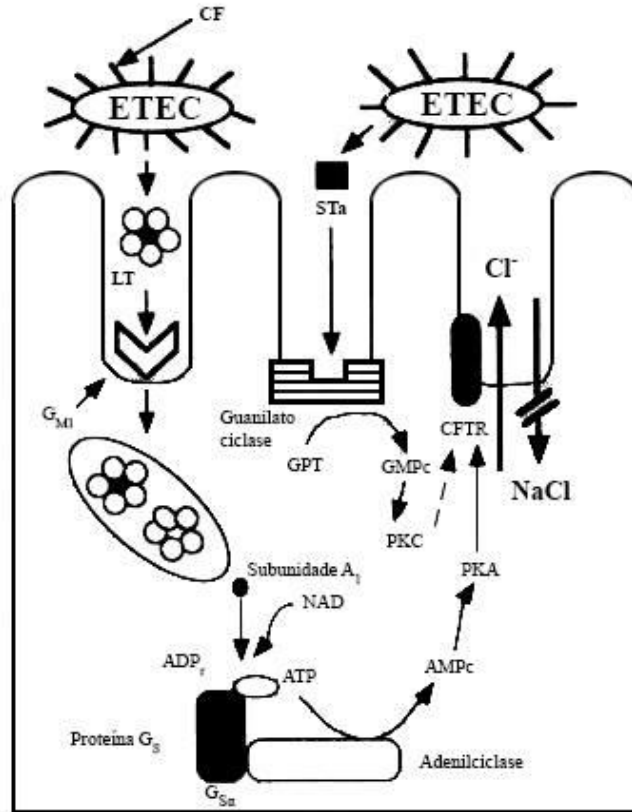


Figura 15. Mecanismos de ação das toxinas LT e STa. Adaptado, com modificações (Deshpande, 2002).

Este é o mecanismo principal das toxinas LT, podendo haver outros mecanismos que acontecem simultaneamente e que têm sido estudados a partir de testes com a toxina colérica.

6.2.4. Toxinas termoestáveis (ST)

As ST são toxinas pequenas e monoméricas e contêm seis resíduos de cisteína ligados por três pontes dissulfeto. Estas ligações contribuem para a termoestabilidade da toxina, isto é, para a sua resistência à desnaturação pelo calor (Nataro e Kaper, 1998). A maioria dos genes que codificam as toxinas ST encontram-se em plasmídeos e os restantes em transposões.

Existem duas classes de toxinas ST em ETEC: STa (ou STI) e STb (ou STII). Enquanto que a STb é um péptido maior (5,1 kDa), é insolúvel em metanol e é apenas encontrada em ETEC, a STa é menor (2 kDa), é solúvel em metanol e é produzida por outras bactérias Gram negativo. (Forsythe, 2002a; Fratamico e Smith, 2006; Nataro e Kaper, 1998).

No interior da bactéria é sintetizada uma proteína precursora de STa, constituída por 72 aminoácidos. Esta é clivada e transformada na toxina madura, de 18 aminoácidos e é libertada para o ambiente exterior (Fratamico e Smith, 2006). Já à superfície dos enterócitos, liga-se preferencialmente ao recetor guanilato ciclase C (GC-C). Esta enzima também serve de recetor para uma molécula endógena, a guanilina (Nataro e Kaper, 1998), que regula a homeostase intestinal e renal (Forsythe, 2010). STa “imita” a guanilina, isto é, compete com o seu recetor, e causa a diarreia.

A ligação de STa ao recetor GC-C estimula a produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) dentro do enterócito. O aumento dos níveis intracelulares de GMPc causa o aumento da secreção de iões cloreto e/ou inibição da absorção de NaCl, levando à secreção de fluídos e eletrólitos para o lúmen intestinal (**Figura 15**).

Este mecanismo também pode envolver a ativação da PKC, aumento dos níveis intracelulares de cálcio, rearranjo dos filamentos de actina polimerizada e libertação de fosfatidilinositol e diacilglicerol (Nataro e Kaper, 1998).

As toxinas Sta causam um efeito temporário de ação rápida (menos de 5 minutos) mediado pela ligação à guanilato ciclase (apenas a que está presente nos intestinos). Opostamente, as toxinas LT, tal como a toxina colérica, causam um efeito prolongado e de ação demorada (cerca de uma hora) e são capazes de se ligar à adenilciclase de diferentes tecidos (Fratamico e Smith, 2006). Tanto o GMPc (aumentado pelas STa) como o AMPc (aumentado pelas LT) são moléculas sinalizadoras importantes e, quando há uma alteração ao nível da produção de uma delas, são alterados vários processos celulares, como as bombas de iões, alterando a secreção de fluídos e eletrólitos para o lúmen intestinal (**Figura 16**) (Forsythe, 2002a).

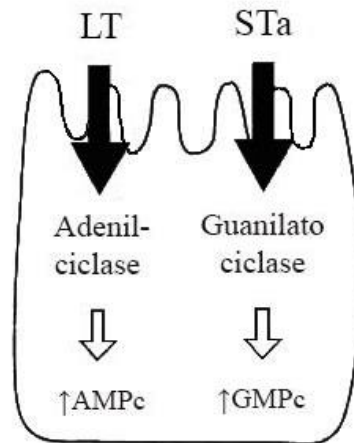


Figura 16. Aumento do AMPc e do GMPc pelas toxinas LT e STa, respetivamente. Adaptado, com modificações (Forsythe, 2010).

Em relação à toxina STb, normalmente é encontrada em isolados de células de porco e em algumas estirpes humanas. Esta toxina tem uma ação diferente da STa: induz a destruição e atrofia parcial das microvilosidades dos enterócitos. Também estimula o aumento da secreção do bicarbonato intracelular para o lúmen, aumento dos níveis intracelulares de cálcio e libertação de PGE₂ e de serotonina, apontando para uma intervenção do SNC neste mecanismo. Este mecanismo conduz igualmente à secreção de eletrólitos (Kaper *et al.*, 2004; Nataro e Kaper, 1998).

6.2.2. Locus tia e tib

Nas ETEC, existem dois locus diferentes: tia e tib, codificados cromossomicamente, que permitem a síntese das proteínas Tia e TibA, respetivamente (Lindenthal e Elsinghorst, 2001; Torres *et al.*, 2005).

TibA é uma adesina importante com muita afinidade para vários tipos de células humanas, é uma invasina eficaz, auxilia na agregação das bactérias e estimula a formação de biofilme à superfície dos enterócitos. Porém, para garantir a ligação de TibA aos enterócitos, é necessária a sua glicosilação, por intermédio de uma

glicosiltransferase codificada pelo gene *tibC* (Sherlock *et al.*, 2005). De facto, quando é removido o locus *tib*, a aderência e a invasão das estirpes reduzem em cerca de 75% (Lindenthal e Elsinghorst, 2001).

Em relação à proteína Tia, esta confere a capacidade de aderência e invasão a estirpes de laboratório, sugerindo que Tia é uma adesina e invasina, assim como TibA. Quando é removido o locus *tia*, a aderência e invasão de células epiteliais ficam reduzidas.

Ainda não foi provado cientificamente que as ETEC conseguem invadir enterócitos durante a infeção. Porém, são capazes de invadir linhas celulares provenientes do íleo, ceco e cólon humanos (Mammarappallil e Elsinghorst, 2000).

VII. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

7.1. Etiologia e Sintomas

As EAEC causam diarreia persistente (dura mais de duas semanas) e são definidas pelo seu mecanismo de adesão agregativa (Donnenberg, 2013; Forsythe, 2002b; Murray *et al.*, 2009). São também associadas a má nutrição e crescimento retardado em crianças, quando não ocorre diarreia (Forsythe, 2010).

Os surtos ocorrem tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (Torres *et al.*, 2005). Foram relatados surtos na Europa, Estados Unidos e Japão (Murray *et al.*, 2009).

As EAEC são parecidas com as ETEC devido ao facto de se ligarem às células do intestino delgado e não causarem lesões histológicas na membrana celular dos enterócitos, porém não se aderem uniformemente como as ETEC, mas sim formam aglomerados em pequenos grupos. Além disso, também não são capazes de invadir os enterócitos.

7.2. Mecanismo de patogenicidade

As EAEC podem produzir fímbrias de aderência; toxinas do tipo ST, denominadas EAST (toxinas termoestáveis enteroagregativas); toxinas Pet (*Plasmid-encoded toxin*) e uma toxina do tipo hemolisina, de 120 kDa. Algumas estirpes podem produzir toxinas do tipo Shiga (Forsythe, 2002a; Fratamico e Smith, 2006), mas não produzem toxinas LT ou ST (Nataro e Kaper, 1998).

Na realidade, foi demonstrado que as EAEC são um grupo muito heterogéneo no que toca a fatores de virulência e capacidade para causar diarreia em adultos, tornando difícil a sua identificação, bem como o seu diagnóstico. É de salientar que nem todas as estirpes produzem toxinas EAST1 ou Pet e nem todas produzem fímbrias de aderência, por exemplo. De facto, existem mais de 50 serogrupos O diferentes de EAEC.

7.2.1. Aderência agregativa

As EAEC diferenciam-se pelo seu modo de aderência: padrão de aderência agregativa ou padrão AA, que pode estar presente em algumas estirpes não patogênicas (Fratamico e Smith, 2006). Neste padrão, as bactérias aglutinam-se, formando uma camada comparada a um empilhamento de tijolos, em vez de formarem microcolônias (Forsythe, 2002a; Nataro e Kaper, 1998).

As fímbrias de aderência facilitam a colonização inicial das *E. coli* na superfície intestinal. Algumas estirpes de EAEC possuem fímbrias de aderência agregativa I, AAF/I, as quais se tratam de estruturas fimbriais de *bundle-forming*, contudo não mostram ser homólogas às fímbrias do tipo IV (os BFP de EPEC pertencem a este grupo de fímbrias, por exemplo) (Nataro e Kaper, 1998). Também foram identificadas as AAF/II e III (Rendon *et al.*, 2007). As AAF/II podem ser determinantes na colonização, visto que uma mutação nas AAF/II da estirpe 042 impossibilita a sua aderência à mucosa intestinal.

Após a colonização inicial, as EAEC estimulam a secreção de muco intestinal e é formado um biofilme contendo uma grande densidade destes microrganismos. O biofilme, para além de proteger as EAEC da atividade de antibióticos e das células do sistema imunitário (leucócitos) (Murray *et al.*, 2009; Nataro e Kaper, 1998), também cobre a superfície intestinal, proporcionando uma colonização persistente e uma redução da absorção de nutrientes pelos enterócitos.

7.2.2. Citotoxinas

Algumas estirpes de EAEC têm a capacidade de provocar efeitos citotóxicos nas células da mucosa intestinal através de citotoxinas. Provocam a formação de vesículas da membrana das microvilosidades dos enterócitos e separação do núcleo do citoplasma envolvente, resultando na morte celular e consequentes danos na mucosa intestinal (Nataro e Kaper, 1998).

7.2.3. EAST1 e PET

A EAST1, toxina termoestável 1 de *E. coli* enteroagregativa, é codificada pelo gene *astA* e pode ser produzida por outras *E. coli* diarreiogénicas e algumas estirpes comensais (Ménard e Dubreuil, 2002). É mais produzida em estirpes de EHEC do que em EAEC, curiosamente.

É uma toxina termoestável de codificação plasmidial. Contém quatro resíduos de cisteína, tal como a guanilina, que também é homóloga à STa de ETEC (esta última possui seis resíduos do aminoácido), como já foi mencionado. Por esta razão, EAST1 tem um mecanismo semelhante à STa, competindo com a guanilina pelo mesmo recetor, quebrando a homeostase intestinal (Forsythe, 2010; Nataro e Kaper, 1998).

Adicionalmente, as EAEC produzem toxinas Pet (*Plasmid-encoded toxin*), que, como demonstra o seu nome, são de codificação plasmidial. Tal como EAST1, a toxina Pet estimula a secreção de fluídos no intestino (Murray *et al.*, 2009).

7.2.4. Outros mecanismos

Recentemente, foi encontrada uma nova flagelina em EAEC que induz a libertação de IL-8. Esta substância quimiotática atrai os neutrófilos para o local de infeção, conduzindo ao rompimento dos tecidos e ao agravamento da secreção de fluídos (Kaper *et al.*, 2004).

VIII. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

8.1. Etiologia e Sintomas

As infecções por EIEC são mais usuais em países subdesenvolvidos, principalmente em crianças, sendo também associadas à diarreia de viajante. O seu maior reservatório é o trato gastrointestinal humano (Fratamico e Smith, 2006).

Inicialmente a doença é caracterizada pela ocorrência de diarreia aquosa (Murray *et al.*, 2009), evoluindo para febre, arrepios, dores de cabeça, mialgia, dores abdominais e disenteria ou diarreia abundante (Doyle e Padhye, 1989) que pode conter sangue e leucócitos (Sousa, 2000). Os sintomas são indistinguíveis de uma shigelose e o mecanismo de patogenicidade é idêntico (Doyle e Padhye, 1989; Sousa, 2000), mas como não produzem toxinas Shiga, não causam HUS (Forsythe, 2010). A sua dose infecciosa é maior, comparando com a de *Shigella* spp., sendo incomum a transmissão direta.

A infecção por EIEC é definida pela penetração das bactérias na mucosa do cólon via endocitose e a sua multiplicação no citoplasma dos enterócitos, destruindo a mucosa, e migrando lateralmente para células adjacentes. Não ocorre produção de toxinas (Donnenberg, 2013; Doyle e Padhye, 1989; Fratamico e Smith, 2006; Rodrigues *et al.*, 2004)

8.2. Mecanismo de patogenicidade

As EIEC são capazes de invadir os enterócitos, multiplicando-se no ambiente intracelular. O mecanismo de invasão da mucosa é semelhante ao da bactéria *Shigella*. Apesar de ser possível a distinção da EIEC e *Shigella* em testes bioquímicos, partilham os mesmos fatores de virulência (Kaper *et al.*, 2004).

8.2.1. Invasividade

As EIEC colonizam o cólon e possuem um plasmídeo de 140 MDa (pINV) que codifica todos os genes necessários para a invasividade (Fratamico e Smith, 2006).

Tal como em espécies de *Shigella*, a invasão da mucosa envolve a penetração do epitélio, lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento das bactérias no citoplasma da célula, migração para a célula adjacente e apoptose se a célula invadida for um macrófago. A destruição da mucosa com infiltrações inflamatórias pode levar ao aparecimento de úlceras (Murray *et al.*, 2009; Nataro e Kaper, 1998; Puente e Finlay, 2001).

O movimento citoplasmático é realizado através de uma “cauda” situada numa das extremidades da bactéria, formada pela nucleação dos filamentos de actina (Kaper *et al.*, 2004; Nataro e Kaper, 1998). A cauda de actina permite a propulsão da bactéria no citoplasma, movimentação através da membrana plasmática basolateral e propagação para células adjacentes (Fratamico e Smith, 2006).

Também são capazes de montar um sistema de secreção do tipo III (SST3), homólogo ao de EPEC e EHEC, codificado pelos loci *mxi* e *spa*. O SST3 transfere as proteínas secretadas, como os Ipa (antígenos plasmidiais de invasão): IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, responsáveis pela invasividade das EIEC (Nataro e Kaper, 1998; Torres *et al.*, 2005). Estas invasinas são codificadas pelo locus *ipa*.

Primeiramente, IpaB e IpaC formam um complexo à superfície do enterócito que permite a entrada da bactéria e de proteínas efetoras, como IpaA. EIEC é endocitada e, através de IpaB, a bactéria lisa o endossoma e ganha acesso ao citoplasma da célula hospedeira. Então, ocorre a formação de uma “cauda” composta por filamentos de actina. Além de EIEC e *Shigella*, outros patógenos utilizam componentes do citoesqueleto das células hospedeiras para se movimentarem em ambiente intracelular, como é o caso de *Listeria* e *Rickettsia*. A proteína de superfície IcsA (ou VirG) é responsável pela formação da “cauda” de actina e pelo movimento intracelular de EIEC (**Figura 17**) (Sansonetti *et al.*, 2001).

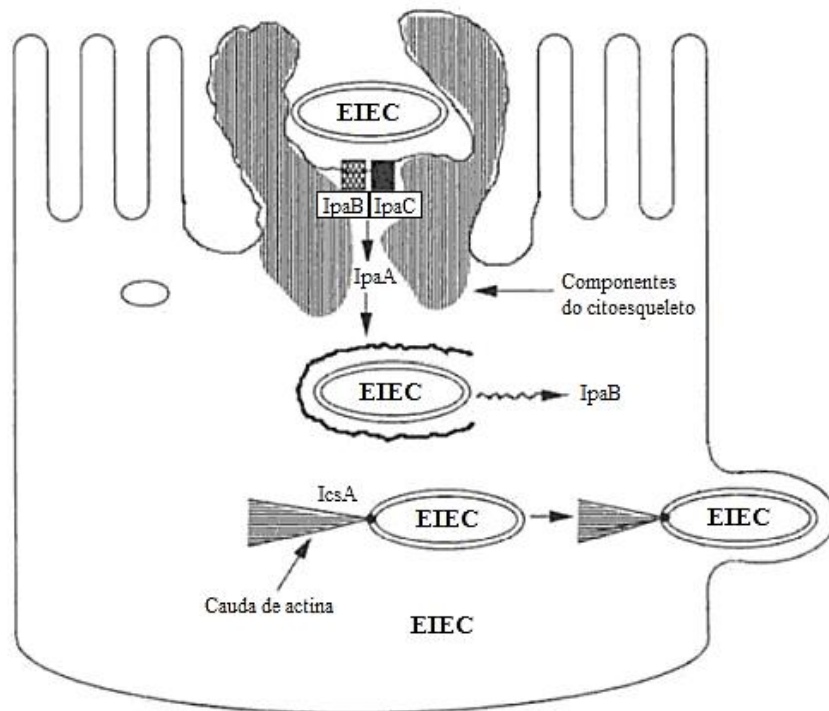


Figura 17. Mecanismo de invasão das EIEC. Adaptado, com modificações (Puente e Finlay, 2001).

IX. *E. coli* de adesão difusa (DAEC)

9.1. Etiologia e Sintomas

As DAEC possuem um padrão de adesão, no qual as bactérias se aderem de forma difusa à superfície da mucosa intestinal.

As infecções por DAEC causam diarreia aquosa sem sangue/muco (Nataro e Kaper, 1998). O grupo mais suscetível são as crianças entre 4-5 anos de idade em países subdesenvolvidos, sendo que as crianças amamentadas têm imunidade passiva, uma vez que o leite materno humano contém proteínas que impedem a aderência das DAEC aos enterócitos (Fratamico e Smith, 2006).

São associadas de forma inconsistente com diarreia e os sintomas não são tão graves como os das outras categorias de *E. coli*, sendo a sua patogenicidade pouco conhecida (Servin, 2005; Torres *et al.*, 2005).

9.2. Mecanismo de patogenicidade

O mecanismo de aderência difusa nas DAEC é mediado pela ação da adesina AIDA-I (adesina envolvida na aderência difusa I) e das adesinas afimbriais (Afa) ou fimbriais (Dr). Todas as adesinas da família Dr são capazes de induzir o crescimento das projeções em forma de “dedo” (**Figura 18**) na membrana celular dos enterócitos. Dentro das adesinas Dr, destaca-se a adesina fimbrial F1845 (Kaper *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2005).

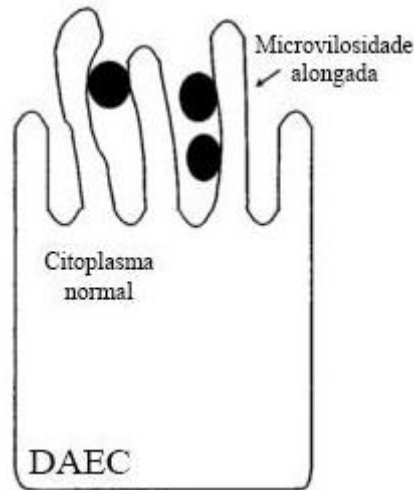


Figura 18. Projeções em forma de “dedo” e microvilosidades alongadas na infecção por DAEC. Adaptado, com modificações (Nataro e Kaper, 1998).

9.2.1. Adesina fimbrial F1845

Algumas DAEC possuem fímbrias F1845 que permitem a aderência difusa e cuja expressão depende do grupo de genes *daa* (Servin, 2005). O gene *daaC* é utilizado para detetar estirpes desta classe de *E. coli* (Fratamico e Smith, 2006).

A subunidade DaaE desta adesina liga-se ao recetor DAF (*decay-accelerating factor* – factor de aceleração de decaimento) presente no enterócito. Esta ligação causa modificações celulares tais como a alongação e nucleação de microvilosidades, projeções da membrana plasmática e rearranjo da actina-F. Estimulam a expressão de IL-8 e migração de células polimorfonucleares, causando inflamação, e aumentam a expressão de DAF à superfície celular.

Apesar das DAEC não invadirem os enterócitos, *beads* revestidas com F1845 têm capacidade de invasão, podendo ser chamadas de invasinas neste caso (Torres *et al.*, 2005).

9.2.2. AIDA-I

A AIDA-I, adesina de 100 kDa (Fratamico e Smith, 2006), foi identificada na estirpe clínica 2787 (Torres *et al.*, 2005) e noutras estirpes. É responsável pela aderência difusa e pela virulência de DAEC.

Estas estirpes expressam proteínas semelhantes às codificadas pelos genes da ilha de patogenicidade LEE das EPEC, como por exemplo proteínas homólogas a EspA, EspB e EspD, provocando a acumulação de actina-F e proteínas fosforiladas. Efetivamente, no local de contacto da bactéria, são formados pedestais e/ou alongamentos da membrana celular semelhantes a lesões A/E (Servin, 2005).

Algumas estirpes causam a formação de projeções em forma de “dedo”, que envolvem as bactérias, protegendo-as da ação dos antibióticos (por exemplo, a gentamicina).

X. Terapia de reidratação oral

A formulação de terapia de reidratação oral recomendada pela Organização Mundial da Saúde consiste cloreto de sódio, glicose, cloreto de potássio e citrato trissódico. Isto porque sódio e potássio são essenciais para a restauração do equilíbrio eletrolítico, a glicose auxilia a absorção de sódio pelos enterócitos e o citrato corrige a acidose resultante da desidratação e da diarreia (*WHO/UNICEF Oral rehydration salts - Production of the new ORS*, 2006).

Em casos graves, deve-se proceder à hidratação venosa (Dirita, 2001).

XI. Prevenção

Além da terapia de reidratação oral e outros tratamentos, a prevenção das infecções entéricas por *Escherichia coli* é essencial para diminuir as taxas de morbidade e mortalidade (Dirita, 2001; Fratamico e Smith, 2006; Nataro e Kaper, 1998; WHO/UNICEF *Oral rehydration salts - Production of the new ORS*, 2006).

A prevenção destas infecções consiste em:

- Distribuir informação pela população em geral;
- Aplicar programas de segurança alimentar;
- Eliminar bactérias patogénicas no processo de produção alimentar e de produtos ou objetos utilizados em agricultura;
- Lama para animais e resíduos fecais devem permanecer longe de campos de cultivo;
- Evitar nadar/brincar em águas contaminadas;
- Apenas beber água potável e utilizá-la para lavar frutos e vegetais, lavando-os cuidadosamente;
- Evitar a contaminação cruzada, não utilizando diferentes utensílios de cozinha para preparar diferentes alimentos (por exemplo, a faca utilizada para cortar carne crua deve ser lavada antes de ser utilizada para outros fins);
- Separar alimentos crus dos alimentos já cozinhados;
- Lavar as mãos antes e depois: da preparação de alimentos; entre a preparação de alimentos; das refeições; das idas à casa de banho; das mudas de fralda;
- Lavar bem as mãos, principalmente em quintas, onde pode haver gado e, conseqüentemente, solo contaminado;
- Cuidar da higiene de pessoas com pouca autonomia (principalmente crianças) (George, 2011; Reilly, 1998);
- Implantar saneamentos públicos eficientes e apropriados (Nataro e Kaper, 1998);
- Implantar procedimentos de APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) na agricultura e realizar tratamento prévio do esterco de animais para não haver contaminação de legumes, verduras e frutas (Vranjac, 2002);

- Beber apenas leite pasteurizado e mantê-lo a temperatura igual ou inferior a 5°C³ (Massa *et al.*, 1999);
- Vacinação (Ihssen *et al.*, 2010).

Para além disto, nos últimos anos tem sido importante o desenvolvimento de vacinas para o gado, com o objetivo de diminuir a transmissão de *E. coli* para os seres humanos (Matthews *et al.*, 2013).

Tal como foi referido no capítulo 2 deste trabalho – Microbiota Intestinal Saudável –, a flora intestinal normal pode funcionar como uma barreira contra os patogénios. Nos últimos anos, tem decorrido uma forte investigação e uma crescente utilização de probióticos neste âmbito. Estes probióticos são microrganismos vivos que ajudam a manter o equilíbrio da flora intestinal do indivíduo, visando prevenir e diminuir os sintomas das infeções gastroentéricas (Guerreiro *et al.*, 2010).

³ A esta temperatura as STEC (por exemplo) são incapazes de se multiplicar ou produzir toxinas.

Considerações Finais

Este trabalho alcançou o objetivo de avaliar a participação de *E. coli* como patógeno intestinal, não só diferenciando as classes mais importantes de *E. coli* diarreiogénicas, como também identificando os principais mecanismos de virulência implicados na patogénese de cada uma delas. Os seus fatores de virulência são fundamentais para a sua aderência ao epitélio intestinal, persistência, secreção de proteínas e/ou invasão.

Nos últimos anos, pesquisas avançadas na área dos diferentes mecanismos de virulência de *E. coli* diarreiogénicas permitiram uma maior compreensão dos detalhes da sua patogénese e conseqüentemente um aumento no conhecimento dos mecanismos moleculares em células humanas e de outros mamíferos.

Este microrganismo é muito versátil, tendo uma grande capacidade de adquirir novos fatores de virulência e criar novos patógenos. Assim, a aquisição de novos fatores de virulência por uma estirpe anuncia a sua capacidade de causar novas doenças, sendo determinante o conhecimento dos mecanismos de ação para a criação de novas terapêuticas e vacinas.

É de extrema importância a divulgação de informação sobre a terapia de reidratação oral e implantação de bons serviços de abastecimento de água e saneamento básico em países subdesenvolvidos, onde as infecções entéricas são bastante frequentes e a taxa de mortalidade devido a diarreia é elevada.

Por outro lado, em países industrializados, deve-se aperfeiçoar as medidas de prevenção para evitar surtos, nomeadamente aumentando o controlo na indústria alimentar. Além disso, os Profissionais de Saúde devem informar os utentes para que tomem conhecimento das medidas de prevenção primária para diminuir os casos de infeção entérica por *E. coli*. O Ministério da Saúde tem um papel importante no esclarecimento do público em geral, podendo utilizar meios de comunicação de grande alcance, nomeadamente televisão e Internet.

Bibliografia

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. e Pillai, S. (2008). Mecanismos efetores da imunidade humoral. In: Abbas, A. K., Lichtman, A. H. e Pillai, S. (Eds.) *Imunologia celular e molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, pp. 321-325.
- Almeida, C., *et al.* (2013). Detection of *Escherichia coli* O157 by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) and comparison to a standard culture method. *American Society for Microbiology*, 79(20), pp. 1-8.
- Anantha, R. P., Stone, K. D. e Donnenberg, M. S. (2000). Effects of bfp mutations on biogenesis of functional enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pili. *Journal of Bacteriology*, 182(9), pp. 2498–2506.
- Bedani, R. e Rossi, E. A. (2009). *Microbiota intestinal e probióticos: implicações sobre o câncer de cólon* [Em linha]. Disponível em: <http://www.scielo.oces.mctes.pt/pdf/ge/v16n1/v16n1a03.pdf> [Consultado em: 23/05/2014].
- Berg, R. D. (1983). Host Immune Response to Antigens of the Indigenous Intestinal Flora. In: Hentges, D. J. (Ed.) *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Academic Press, pp. 101-118.
- Bertão, A. M. S. e Saridakis, H. O. (2007). *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 28(2), pp. 81-92.
- Blum, A. (2014). *Reed biologists investigate a gut-wrenching mystery* [Em linha]. Disponível em: http://www.reed.edu/reed_magazine/march2013/articles/features/mellies.html [Consultado em: 24/10/2014].
- Brinkmann, V. (2010). *Enteropathogenic Escherichia coli Bacteria on human epithelial cells. Note how they induce the surface of the cells to form so-called pedestals. SEM* [Em linha]. Disponível em: <http://www.visualsunlimited.com/image/I0000iCuYClBfnKo> [Consultado em: 21/07/2014].
- Brooks, G. F. e Carroll, K. C. (2011). Patogenia de la infección bacteriana. In: Butel, J. S., *et al.* (Eds.) *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología Médica*. 25ª ed. Cidade do México: McGraw-Hill Interamericana, pp. 145-158.
- Buckley, C. (2012). *How E. coli cells work in the human gut* [Em linha]. Disponível em: <http://today.uconn.edu/blog/2012/07/how-e-coli-cells-work-in-the-human-gut/> [Consultado em: 27/06/2014].
- Caprioli, A., *et al.* (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, 36, pp. 289-311.

- Dean, P. (2009). *E. coli Virulence Proteins* [Em linha]. Disponível em: <https://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/> [Consultado em: 24/08/2014].
- Dean, P. e Kenny, B. (2009). The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol*, 12(1-3), pp. 101-109.
- Deshpande, S. S. (2002). Bacterial toxins. In: Deshpande, S. S. (Ed.) *Handbook of Food Toxicology*. Marcel Dekker.
- Dirita, V. J. (2001). Molecular basis of *Vibrio cholerae* pathogenesis. In: Groisman, E. A. (Ed.) *Principles of Bacterial Pathogenesis*. pp. 457-509.
- Donnenberg, M. (2013). Introduction. In: Donnenberg, M. S. (Ed.) *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. 2ª ed. Londres: Academic Press, pp. xvii-xx.
- Doyle, M. P. e Padhye, V. V. (1989). *Escherichia coli*. In: Doyle, M. P. (Ed.) *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, pp. 235-282.
- Elsinghorst, E. A. (2002). Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg, M. (Ed.) *E. coli: Genomics, Evolution and Pathogenesis*. 2ª ed. London: Elsevier Science, pp. 156-188.
- Flores, J. e Okhuysen, P. C. (2010). Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Bantham Science Publishers, pp. 84-94.
- Forssten, S., Lahtinen, S. J. e Ouwehand, A. C. (2011). The Intestinal Microbiota and Probiotics. In: Malago, J. J., Koninkx, J. F. J. G. e Marinsek-Logar, R. (Eds.) *Probiotic Bacteria and Enteric Infections: Cytoprotection by Probiotic Bacteria*. Springer Science & Business Media, pp. 41-64.
- Forsythe, S. J. (2002a). Doenças de origem alimentar. In: Forsythe, S. J. (Ed.) *Microbiologia da segurança alimentar*. Artmed, pp. 65-108.
- Forsythe, S. J. (2002b). Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: Forsythe, S. J. (Ed.) *Microbiologia da segurança alimentar*. Artmed, pp. 164-168.
- Forsythe, S. J. (2010). Foodborne infections and intoxications. In: Forsythe, S. J. (Ed.) *The Microbiology of Safe Food*. 2ª ed. Oxford: Wiley-blackwell, pp. 1-51.
- Fraser, G., et al. (2013). *Annual epidemiological report - Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data - 2013* [Em linha]. Disponível em: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/annual-epidemiological-report-2013.pdf> [Consultado em: 18/12/2013].
- Fratamico, P. M. e Smith, J. L. (2006). *Escherichia coli*. In: Riemann, H. P. e Cliver, D. O. (Eds.) *Foodborne Infections and Intoxications*. 3ª ed. Londres: Elsevier, pp. 205-258.

- George, F. H. M. (2011). *Orientação nº 024/2011 de 09/06/2011: Surto por Escherichia coli enterohemorrágica na Alemanha - Atualização.*
- Gordon, D. M. (2013). The ecology of *Escherichia coli*. In: Donnenberg, M. (Ed.) *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. 2ª ed. Londres: Academic Press, pp. 3-14.
- Guerreiro, A. S., Ferreira, G. C. e Cremers, M. I. (2010). *Probióticos em medicina geral e familiar - aplicações na área gastroenterológica*. Publicações SPED | Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva.
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, 85, pp. E45-E62.
- Högberg, L. D. e Heuer, O. (2011). *European Centre for Disease Prevention and Control - Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2011; Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network: Stockholm, Sweden, 2011* [Em linha]. Disponível em: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf> [Consultado em: 19/12/2013].
- Ihssen, J., Kowarik, M. e Thöny-Meyer, L. (2010). Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 9(61), pp. 494-497.
- Jinadasa, R. N., *et al.* (2011). Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology*, 157(7), pp. 1851-1875.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. e Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp. 123-140.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8, pp. 634-644.
- Kenny, B. (1999). Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modification. *Molecular Microbiology*, 31(4), pp. 1229-1241.
- Kenny, B. e Warawa, J. (2001). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. *Infection and Immunity*, 69(3), pp. 1444-1453.
- Lima, A. a. M. e Fonteles, M. C. (2014). From *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous guanylin hormones. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(3), pp. 179-191.
- Lin, C. N., *et al.* (2014). Protein interactions and regulation of EscA in enterohemorrhagic *E. coli*. *PLoS One*, 9(1), pp. 1-9.

- Lindenthal, C. e Elsinghorst, E. A. (2001). Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infection and Immunity*, 69(1), pp. 52-57.
- Lu, L. e Walker, W. A. (2001). Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, pp. 1124S-1130S.
- Mammarappallil, J. G. e Elsinghorst, E. A. (2000). Epithelial cell adherence mediated by the enterotoxigenic *Escherichia coli* Tia protein. *Infection and Immunity*, 68(12), pp. 6595-6601.
- Massa, S., *et al.* (1999). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 °C. *Letters in Applied Microbiology*, 28, pp. 89-92.
- Matthews, L., *et al.* (2013). Predicting the public health benefit of vaccinating cattle against *Escherichia coli* O157. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, pp. 16265-16270.
- Mcdaniel, T. K. e Kaper, J. B. (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 23(2), pp. 399-407.
- Ménard, L. P. e Dubreuil, J. D. (2002). Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 (EAST1): A New Toxin with an Old Twist. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(1), pp. 43-60.
- Mendes, B. (2010). Microbiologia da água. *In*: Wanda, F. C. F., Sousa, J. C. F. e Lima, N. (Eds.) *Microbiologia*. Lidel, pp. 510.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. e Pfaller, M. A. (2009). Enterobacteriaceae. *In*: Murray, P. R., Rosenthal, K. S. e Pfaller, M. A. (Eds.) *Microbiologia Médica*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp. 299-314.
- Nataro, J. P. e Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), pp. 142-201.
- National Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) Surveillance Overview* [Em linha]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/national-stec-surveillance-overview-508c.pdf> [Consultado em: 19/08/2014].
- Oliveira, I. R., *et al.* (2007). Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to Caco-2 cells by human milk and its immunoglobulin and non-immunoglobulin fractions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), pp. 86-92.
- Ozaki, C. Y., Rocha, L. B. e Piazza, R. M. F. (2009). *Resumo - 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia: Localização celular da toxina termo-lábil (LT) de Escherichia coli enterotoxigênica (EPEC)* [Em linha]. Disponível em: <http://sbmicrobiologia.org.br/pdf/cdsbm/resumos/R1790-1.html> [Consultado em: 3/9/2014].

- Pacheco, A. R. e Sperandio, V. (2012). Shiga toxin in enterohemorrhagic E.coli: regulation and novel anti-virulence strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(81), pp. 1-12.
- Paiva, A. e Kotze, L. (2003). Diarreia infecciosa aguda. In: Kotze, L. e Barbieri, D. (Eds.) *Afecções gastrointestinais da criança e do adolescente*. Rio de Janeiro: Revinter, pp. 225-241.
- Parreira, R. (2002). Bacteriófagos. In: Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. F. (Eds.) *Microbiologia: Volume 3*. Lidel, pp. 366-367.
- Pathogenic E. coli* [Em (2004). linha]. Disponível em: <http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/> [Consultado em: 18/12/2014].
- Prager, R., et al. (2014). Two novel EHEC/EAEC hybrid strains isolated from human infections. *PLoS One*, 9(4), pp. 1-10.
- Puente, J. L. e Finlay, B. B. (2001). Pathogenic *Escherichia coli*. In: Groisman, E. A. (Ed.) *Principles of Bacterial Pathogenesis*. Academic Press, pp. 388-456.
- Reilly, A. (1998). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections: memorandum from a WHO meeting. WHO Consultation on Prevention and Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections. *Bull World Health Orga*, 76(3), pp. 245-255.
- Rendon, M. A., et al. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, pp. 10637-10642.
- Rodrigues, J., et al. (2004). Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in brazilian infants. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), pp. 398-400.
- Round, J. L. (2013). From fly to human: understanding how comensal microorganisms influence host immunity and health. In: Fredricks, D. N. (Ed.) *The Human Microbiota: How Microbial Communities Affect Health and Disease*. Wiley-Blackwell, pp. 255-272.
- Ruchaud-Sparagano, M. H., Maresca, M. e Kenny, B. (2007). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. *Cell Microbiol*, 9, pp. 1909-1921.
- Sahl, J. W., Morris, C. R. e Rasko, D. A. (2013). Comparative genomics of pathogenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg, M. (Ed.) *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. Academic Press, pp. 21-37.
- Sansonetti, P. J., Egile, C. e Wennerås, C. (2001). Shigellosis: from disease symptoms to molecular and cellular pathogenesis. In: Groisman, E. A. (Ed.) *Principles of Bacterial Pathogenesis*. Academic Press, pp. 336-387.

- Sartor, R. B. e Mazmanian, S. K. (2012). Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *American Journal of Gastroenterology Supplements*, 1, pp. 15-21.
- Schuller, S., *et al.* (2009). The ex vivo response of human intestinal mucosa to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Cellular Microbiology*, 11, pp. 521-530.
- Servin, A. L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology*, 18(2), pp. 264–292.
- Sherlock, O., Vejborg, R. M. e Klemm, P. (2005). The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infection and Immunity*, 73(4), pp. 1954–1963.
- Silva, J. A. e Silva, W. D. (2005). *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. *Revista de patologia tropical*, 34 (3), pp. 175-196.
- Silveira, L., Marques, A. e Machado, J. (2013). Patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções entéricas entre 2002-2012. *Boletim Epidemiológico Observações*, especial 1_doenças infecciosas, pp. 20-22.
- Sousa, J. C. F. (2000). Enterobacteriaceae. In: Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. F. (Eds.) *Microbiologia*. Porto: Lidel, pp. 99-109.
- Steyert, S. R., Rasko, D. A. e Kaper, J. B. (2011). Functional and phylogenetic analysis of ureD in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 193, pp. 875-886.
- Topouzova-Hristova, T., *et al.* (2012). Interaction of two strains of *Escherichia coli* O157 with human epithelial cells. *Science & Technologies*, 2(1), pp. 47-50.
- Torgersen, M. L., *et al.* (2010). The Intracellular Journey of Shiga Toxins. *The Open Toxinology Journal*, 3, pp. 3-12.
- Torres, A. G., Zhou, X. e Kaper, J. B. (2005). Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection and Immunity*, 73, pp. 18-29.
- Vallance, B. A. e Finlay, B. B. (2000). Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), pp. 8799–8806.
- Vieira, M. A., *et al.* (2001). Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic E. coli (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. *J Infect Dis*, 183, pp. 762-772.
- Vieira, M. a. M. (2009). Ilhas de patogenicidade. *O Mundo da Saúde*, 33(4), pp. 406-414.

- Vranjac, A. (2002). *Síndrome Hemolítico-Urêmica - normas e instruções* [Em linha]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/shu.pdf [Consultado em: 14/06/2014].
- WHO/UNICEF *Oral rehydration salts - Production of the new ORS* [Em (2006). linha]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69227/1/WHO_FCH_CAH_06.1.pdf?ua=1&ua=1 [Consultado em: 29/10/2014].
- Yang, K., Pagaling, E. e Yan, T. (2014). Estimating the prevalence of potential enteropathogenic *Escherichia coli* and intimin gene diversity in a human community by monitoring sanitary sewage. *Appl Environ Microbiol*, 80, pp. 119-127.
- Zhu, C., *et al.* (2007). LEE-encoded regulator (Ler) mutants elicit serotype-specific protection, but not cross protection, against attaching and effacing *E. coli* strains. *Vaccine*, 25, pp. 1884-1892.
- Zhu, C. R., *et al.* (2006). Towards a vaccine for attaching/effacing *Escherichia coli*: a LEE encoded regulator (ler) mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is attenuated, immunogenic, and protects rabbits from lethal challenge with the wild-type virulent strain. *Vaccine*, 24, pp. 3845-3855.
- Zoetendal, E. G., *et al.* (2004). Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *The Journal of Nutrition*, 18, pp. 299-313.