UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM DOENÇAS INFECCIOSAS

DIEGO MARTINS LOZER

“PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA EM CRIANÇAS QUILOMBOLAS COM E SEM DIARRÉIA, DO NORTE DO ESPÍRITO SANTO”

VITÓRIA

2011

DIEGO MARTINS LOZER

“PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA EM CRIANÇAS QUILOMBOLAS COM E SEM DIARRÉIA, DO NORTE DO ESPÍRITO SANTO.”

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

Orientadora: Prof. Drª. Liliana Cruz Spano.

Co-Orientadora: Prof. Drª. Isabel C A. Scaletsky.

VITÓRIA

2011

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

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O mestrando DIEGO MARTINS LOZER apresentou a dissertação intitulada: "PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA EM CRIANÇAS QUILOMBOLAS COM E SEM DIARRÉIA, DO NORTE DO ESPÍRITO SANTO" em sessão pública, no dia 27 de maio de 2011, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar o farmacêutico DIEGO MARTINS LOZER, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 27 de maio de 2011

Profa. Dra. Adriana Hamond Regua Mangia
(Membro Externo)

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes
(Membro Interno)

Profa. Dra. Liliana Cruz Spano
(Orientadora)

Profa. Dra. Isabel Cristina Affonso Scaletsky
(Co-Orientadora)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Lozer, Diego Martins, 1985-
L925p Patotipos de *Escherichia coli* diarreiogênica em crianças quilombolas com e sem diarréia, do norte do Espírito Santo / Diego Martins Lozer. – 2011.
129 f. : il.

Orientadora: Liliana Cruz Spano.
Coorientadora: Isabel Cristina Affonso Scaletsky.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Escherichia coli. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Quilombos - Espírito Santo (Estado). I. Spano, Liliana Cruz. II. Scaletsky, Isabel Cristina Affonso. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, porque Ele é digno de toda minha gratidão.

À Drª. Liliana Cruz Spano pela oportunidade e pelo aprendizado durante esse tempo de orientação, desde a iniciação científica ao mestrado.

À Drª. Isabel Cristina Affonso Scaletsky pela importante colaboração neste projeto e, sempre gentil esteve pronta a esclarecer qualquer dúvida.

À Drª. Sônia Maria de Souza Kitagawa que faz parte e contribui para a realização deste projeto.

À Drª. Ana Paula Nunes por aceitar participar da banca examinadora.

À Drª. Adriana Hamond Regua-Mangia por participar da banca examinadora.

Ao professor Fernando Vicentine e a todos os demais colaboradores do CEUNES que participaram deste projeto.

À Mariane, Roger, Lilian e Keyla por terem contribuído para o desenvolvimento da parte prática da dissertação.

À Tamara pela contribuição para o desenvolvimento da parte prática da dissertação e todos os demais colegas da UNIFESP que tive a oportunidade de conhecer.

À Fátima e Wayna por auxiliarem nas questões administrativas do curso de mestrado.

Aos professores do Mestrado, por auxiliar na busca do conhecimento e por compartilhar suas experiências.

Às técnicas de laboratório Erica, Heloisa e Lia por mais do que me auxiliarem na realização dos experimentos, contribuíram para um ambiente de trabalho agradável.

Aos colegas e amigos de turma, Juliana, Thiago, Rafaela, Adriana e de todo o NDI por ajudar e fazer parte desta conquista.

Aos amigos que já fizeram e fazem parte do LabVir e LabGin pela convivência.

Aos meus amigos que me apóiam e sempre posso contar Daniel, Rafael, Wágner, Buth e Danilo.

À minha querida avó Élcia, pelo amor incondicional e toda sua dedicação.

Aos meus pais Pedro e Lucilene, irmãos Pedro Henrich, Alice e Wellington pelo privilégio de tê-los como família.

Aos meus queridos: tia Sônia, tio Gilmar, Rhuan e Bruno, por me acolher e me ensinar.

A toda a minha família que sempre esteve torcendo por minhas conquistas.

À Natalia pelo carinho e companhia que tornaram minhas tarefas mais leves.

À Facitec pelo financiamento do projeto e a Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

A diarréia permanece como importante problema de saúde pública especialmente em crianças pertencentes às famílias de baixo nível sócio-econômico em países em desenvolvimento, particularmente no Brasil. As cepas de *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC) estão entre os principais agentes infecciosos bacterianos de diarréia infantil. Seis patotipos de DEC são descritos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). A detecção de DEC tem sido facilitada pelos ensaios em cultura de células bem como por sondas específicas de DNA para cada patotipo de *E. coli* e usada em ensaios de hibridização. Iniciadores para a PCR também tem sido desenvolvidos para todos os patotipos de DEC. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de cepas de DEC, em crianças menores de 12 anos residentes em Comunidades Quilombolas localizadas nos municípios de São Mateus e Conceição da Barra-Norte do Estado do Espírito Santo. Foram analisadas 425 amostras de fezes de crianças com (n=106) e sem (n=319) diarréia, coletadas entre agosto de 2007 e dezembro de 2009. As fezes foram semeadas em ágar MacConkey e Hektoen, para isolamento de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. e posterior identificação bioquímica. Todas as cepas de *E. coli* foram submetidas aos ensaios de PCR monoplex e multiplex para detecção de: tEPEC (*eaeA*, *bfpA*), aEPEC (*eaeA*), EAEC (CVD432), ETEC (*lt* e/ou *st*), EIEC (*ipaH*) e STEC (*stx1* e/ou *stx2*). As cepas isoladas de *E. coli* também foram submetidas à hibridização de colônia com sondas *eae*, pAA e *afaBC,* e ainda, ao teste de adesão a células HEp-2 para identificação dos padrões de aderência AL, AD e AA. *E. coli* e *Shigella* spp. foram isoladas de 90% e 1,4%, respectivamente, e nenhum caso de *Salmonella* spp. foi encontrado nas crianças. O patotipo mais prevalente foi EAEC (43,9%), seguido pela DAEC (18,1%), aEPEC (13,1%), ETEC (2,3%), tEPEC (0,8%), EIEC (0,5%) e nenhuma caso de STEC foi detectado. Das 168 amostras de EAEC com AA, 40,5% foram detectadas por PCR para CVD432 e 25,6% reagiram com a sonda pAA. A sonda *afaBC* detectou 52,9% dos 69 casos de DAEC. Dentre os patotipos de DEC, somente a DAEC foi significantemente associada à diarréia, 23,6% no grupo diarréia e 13,8% no controle (p=0,022). As infecções mistas foram comuns e também significantemente associadas a crianças com diarréia (p=0,0018).

Palavras-chave: *Escherichia. coli*, Quilombos-Espírito Santo, Reação em cadeia de polimerase.

ABSTRACT

Diarrhea remains an important public health problem for children of low socio-economic level families in developing countries, particularly in Brazil. Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) strains are among the most important bacterial causes of childhood diarrhea. There are six pathotypes of DEC: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), shiga-toxin producing *E. coli* (STEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and diffuse adherent *E. coli* (DAEC). Detection of DEC has been facilitated by tissue culture assays as well as by DNA probes specific to each group of *E. coli* and used in hybridization assays. PCR primers have been also developed for all DEC types. The aim of this study was to investigate the presence of DEC strains, in children under 12 years of age living in Quilombolas Communities in São Mateus and Conceição da Barra-north of the Espirito Santo State. A total of 425 stool samples from children with diarrhea (*n* = 106) and without (*n* = 319) diarrhea were collected between August 2007 and December 2009. Stool samples were examined for the presence of *E. coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp with MacConkey and Hektoen agar. All *E. coli* isolates were screened for the presence of DEC markers by monoplex and multiplex PCRs for detection of tEPEC (*eaeA*, *bfpA*), aEPEC (*eaeA*), EAEC (pCVD432), ETEC (*elt* and *est*), EIEC (*ipaH*), and STEC (*stx1* and *stx2*). *E. coli* isolates were also tested for colony DNA hybridization with by using the *eae*, pAA and *afa*BC probes and by the HEp-2 adhesion assay to identify the LA, DA, and AA adherence patterns. *E. coli* and *Shigella* spp were isolated from 90% and 1.4%, respectively, and no *Salmonella* spp were isolated from any of the children. The most prevalent DEC was EAEC (43.9%), followed by DAEC (18.1%), aEPEC (13.1%), ETEC (2.3%), tEPEC (0.8%), EIEC (0.5%) and 0% EHEC. Of the 168 EAEC with AA, 40.5% were positive with the pCVD432 PCR and 25.6% reacted with the pAA probe. The *afaBC* probe detected 52.9% of the 69 DAEC isolates with DA. DAEC isolates with DA were detected significantly more often in children with diarrhea (23.6%) than in children without diarrhea (13.8%) (*P* = 0.022). In this study, isolation of two or more than two DEC types was common and associated with diarrhea (*P* = 0.0018).

.

Key-words: *Escherichia. coli*, Quilombola Community-Espírito Santo, Polymerase chain reaction.

LISTA DE SIGLAS

AA- Aderência agregativa

AAF- *Aggregative adherence fimbriae* (fatores de aderência agregativa)

aap- Anti-aggregation protein (proteína antiagregrativa)

ACS- Agente Comunitário de Saúde

AD- Aderência difusa

A/E- *Attaching and effacing* (aderência e achatamento)

aggR- Aggregative regulator (regulador de aderência agregativa)

AL- Aderência localizada

AMP- Adenosina monofosfato

Arp 2/3- A*ctin-related protein* (proteína relacionada à actina)

BFP- *Bundle-forming pilus* (*pilus* formador de feixe)

BHI- *Brain heart infusion* (Infusão de cérebro e coração)

BSS- *Balanced saline solution* (Solução salina balanceada)

CCS- Centro de Ciências da Saúde

Cdc42- *Cell division control protein* 42 (Proteína de controle de divisão celular 42)

C-DEC- *Cell-detaching E. coli* (*E. coli* capaz de descolar célula)

CEUNES- Centro Universitário do Norte do Espírito Santo

CFA- *Colonization factor antigen* (fator de colonização)

CLA- *Chain-like adhesion* (aderência em forma de cadeia)

DAEC- *E. coli* de aderência difusa

DAF- *Decay acceleretor factor* (fator de aceleração de decaimento)

DEC- *Escherichia coli* diarreiogênica

DMEM- *Dulbecco Modified Eagle Medium* (Meio Eagle modificado por Dulbecco)

DNA- *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxi-ribonucléico)

eae- *EPEC attaching and effacing* (EPEC-aderência e achatamento)

EAEC- *E. coli* enteroagregativa

EAF- EPEC *adherence factor* (fator de aderência de EPEC)

EAST1- *Heat-stable enterotoxin* (enterotoxina termoestável)

EHEC- *E. coli* enterohemorrágica

EIEC- *E. coli* enteroinvasora

EPEC- *E. coli* enteropatogênica

aEPEC- *E. coli* enteropatogênica atípica

tEPEC- *E. coli* enteropatogênica típica

EspA- *EPEC secreted proteins* (Proteína secretada pela EPEC)

EspF- *EPEC secreted proteins* (Proteína secretada pela EPEC)

ETEC- *E. coli* enterotoxigênica

g- Grama

HeLa- Células de linhagem de carcinoma cervical (Henrietta Lacks)

HEp-2- Células de linhagem de carcinoma epidermóide de laringe humana

IcsA- *Invasion cellular spread* (Proteína de invasão celular)

IL-1- Interleucina 1

IL-8- Interleucina 8

INF-α- Interferon α

KDa- Kilo-Dalton

LabGIn- Laboratório de Gastrenterite Infecciosa

Lac+ - Fermentadora de lactose

Lac- - Não fermentadora de lactose

LEE- *Locus of enterocyte effacement*

LT- Enteroxina termolábil

MILi- Motilidade, indol, Lisina descarboxilase

mL- Mililitros

N-WASP- *Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein* (Proteína da síndrome de Aldrich Wiskott)

OMP- *Outer membrane protein* (proteína de membrana externa)

OMPs- Plural de OMP

pAA- *Plasmid-aggregative adherence* (plasmídio de aderência agregativa)

Pb- Pares de base

PBS- *Phosphate-buffered saline* (salina tampão fosfato)

PCR- *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia pela polimerase)

Pet- *Plasmid-encoded toxin* (toxina codificada por plasmídio)

pInv- Plasmídio de invasividade

PVC- *Polyvinyl chloride* (cloreto de polivinila)

SFB- Soro fetal bovino

ShET1- Enterotoxina 1 de *Shigella*

SHU- Síndrome hemolítica urêmica

SLT- *Shiga-like toxin* (toxina semelhante à de Shiga)

ST- Enterotoxina termoestável

STEC- *E. coli* produtora de toxina de Shiga

Stx- Toxina de shiga

TccP- Tir-*cytoskeleton coupling protein* (proteína acopladora de Tir ao citoesqueleto)

Tir- *Translocated intimin receptor* (receptor de intimina translocado)

TSI- *Triple sugar iron* (tríplice açúcar com ferro)

TTSS- *Type Three Secretion System* (Sistema de Secreção do Tipo III)

UBS- Unidade Básica de Saúde

UFC- Unidade formadora de colônia

UFES- Universidade Federal do Espírito Santo

UNIFESP- Universidade Federal de São Paulo

UV- Ultravioleta

VMVP- Caldo vermelho de metila-Voges Proskauer

µL- Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da patogênese dos patotipos de *E. coli* diarreiogênica..... 26

Figura 2. Genes envolvidos na patogênese de EPEC..... 28

Figura 3. Modelo da transdução de sinal envolvida na lesão A/E desencadeada pela ligação de *E. coli* enteropatogênica em superfície de enterócito..... 30

Figura 4. Esquema da migração basolateral de *E. coli* enteroinvasora..... 33

Figura 5. Padrão de adesão de *Escherichia coli* a células HEp-2 40

Figura 6. Mapa dos municípios de São Mateus e Conceição da Barra e as respectivas Comunidades Quilombolas..... 46

Figura 7. Casa quilombola de construção típica de pau-a-pique, no momento da visita de Agente Comunitário de Saúde 47

Figura 8. Fluxograma do processamento e identificação dos patotipos de DEC por PCR, aderência em cultura de células e hibridização de colônia 56

Figura 9. Teste de hibridização de colônia..... 60

Figura 10. Gráfico demonstrando o número de amostras coletadas nos meses referentes ao período de coleta, compreendido entre o ano de 2007 a 2009..... 66

Figura 11. Padrão de aderência de cepas *E. coli* diarreiogênicas em cultura de células HEp-2 68

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose de produto de amplificação obtido em Ensaio 1 de PCR multiplex com inicadores para genes *eae* e CVD432..... 69

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose de produto de amplificação do Ensaio 2, utilizando iniciadores para genes *lt* e *st* 70

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose de produto de amplificação do Ensaio 2, utilizando iniciadores para o gene *ipaH* 71

Figura 15. Filme de raio-X pelo qual são visualizados os resultados da hibridização de colônia 72

Figura 16. Diagrama de Venn demonstrando relação entre os testes de aderência em cultura HEp-2 (AL) e detecção de *eae* e *bfpA* nas cepas isoladas de tEPEC 73

Figura 17. Diagrama de Venn demonstrando a relação entre os testes de aderência agregativa em células HEp-2 (AA), detecção de CVD432 e pAA..... 74

Figura 18. Gráfico evidenciando a freqüência dos patotipos de DEC..... 76

Figura 19. Frequência dos patotipos de DEC conforme períodos de coleta..... 79

QUADROS

Quadro 1. Principais sorotipos isolados das cepas de EPEC típica e atípica 29

Quadro 2. Sequência de iniciadores usados nos Ensaios 1 e 2 com respectivos genes e tamanhos de fragmentos obtidos 57

Quadro 3. Programas de amplificação usados nas PCR monoplex e multiplex referentes aos Ensaios 1 e 2. 58

Quadro 4. Cepas padrão utilizadas como controles nos ensaios de detecção dos patotipos de DEC..... 60

Quadro 5. Relação das Comunidades Quilombolas nos municípios de São Mateus e Conceição da Barra 63

TABELAS

Tabela 1. Distribuição das amostras fecais obtidas por faixas etárias das crianças quilombolas referentes aos grupos diarréia e controle 65

Tabela 2. Distribuição das amostras fecais obtidas por sexo das crianças quilombolas referentes aos grupos diarréia e controle 65

Tabela 3. Distribuição dos padrões de aderência AL, AA, AD e CLA em relação aos grupos diarréia e controle 68

Tabela 4. Distribuição dos genes pesquisados por PCR nas cepas de *E. coli* isoladas de crianças dos grupos diarréia e controle 71

Tabela 5. Relação entre os casos positivos para o padrão de aderência AA e os casos em que foram detectados o gene CVD432 do total de casos de *E. coli* isoladas 74

Tabela 6. Correlação entre o padrão de aderência AA, inicadores CVD432 e sonda genética pAA na detecção de EAEC 74

Tabela 7. Relação entre o padrão de adesão AD e a sonda genética *afaBC* na detecção de DAEC 75

Tabela 8. Patotipos de DEC detectados fenotipica e genotipicamente nos grupos diarréia e controle 76

Tabela 9. Infecções mistas nos grupos Diarréia e Controle 77

Tabela 10. Frequência de cada patotipo de *Escherichia coli* diarreiogênica encontrado em infecções mistas (n=48) nas crianças quilombolas 78

Tabela 11. Infecções mistas de patotipos de *E. coli* diarreiogênica em crianças quilombolas 78

Tabela 12. A Tabela mostra as freqüências dos patotipos mais comuns de DEC encontrados nos grupos diarréia e controle nas diferentes faixas 78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 REVISÃO DA LITERATURA 23

2.1 CONCEITOS GERAIS E ETIOLOGIA INFECCIOSA DAS DIARRÉIAS 23

2.2 ORIGEM DAS COMUNIDADES QUILOMBOLAS 24

2.3 *Escherichia coli* 25

2.3.1 Características do gênero e espécie 25

2.3.2 Breve descrição, patogênese e epidemiologia dos patotipos de DEC 27

2.3.3 Isolamento e identificação de DEC 38

3 OBJETIVOS 44

3.1 OBJETIVO GERAL 44

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 44

4 MATERIAIS E MÉTODOS 46

4.1 CARACTERÍSTICAS DA ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DO ESTUDO 46

4.2 TIPO DE ESTUDO E DESCRIÇÃO DA AMOSTRA 48

4.3 ARTICULAÇÃO PARA COLETA DOS ESPÉCIMES 48

4.4 ASPÉCTOS ÉTICOS DA PESQUISA 50

4.5 COLETA E TRANSPORTE DO MATERIAL CLÍNICO 50

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli* 51

4.6.1 Caldo Vermelho de Metila-Voges Proskauer 51

4.6.2 Motilidade, Indol, e Lisina descarboxilase (MILi) 52

4.6.3 Tríplice açúcar com ferro (ágar TSI) 53

4.6.4 Citrato de Simmons 53

4.6.5 Ágar Fenilalanina 53

4.7 ESTOCAGEM DAS CEPAS DE *E. coli* 54

4.8 SOROLOGIA 54

4.9 TESTE DE ADESÃO A CÉLULAS HEp-2 54

4.10 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO 55

4.11 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) 55

4.12 TESTE DE HIBRIDIZAÇÃO DE COLÔNIA 58

4.13 CEPAS CONTROLES 60

4.14 CRITÉRIOS DE DETERMINAÇÃO DOS PATOTIPOS DE DEC 61

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA 61

5 RESULTADOS 63

5.1 AMOSTRAS ANALISADAS E DADOS DEMOGRÁFICOS 63

5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli, SHIGELLA* E *SALMONELLA* 67

5.3 DETECCÃO DE *E. coli* DIARREIOGÊNICA (DEC) 67

5.3.1 Padrão de adesão a células HEp-2 67

5.3.2 Pesquisa de genes de virulência 69

5.3.3 Detecção e caracterizacão de EPEC, EAEC E DAEC 72

5.3.4 Frequência dos patotipos de DEC entre as crianças quilombolas 75

5.3.5 Infecção mista 77

5.3.6 Distribuicão dos patotipos de DEC entre familiares 79

5.3.7 Distribuição de patotipos de *E. coli* diarreiogênica por período de coleta 79

5.3.8 Prevalência de DEC nas diversas faixas etárias 80

6 DISCUSSÃO 83

7 CONCLUSÕES 94

8 PERSPECTIVAS 96

9 REFERÊNCIAS 98

10 ANEXOS 119

10.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA..... 119

10. 2 FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA..... 120

10.3 FICHA DE DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS 121

10.4 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS 124

10 5 RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS NO ESTUDO 128

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença diarréica é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todas as regiões do mundo e entre indivíduos de todas as faixas etárias, com especial destaque para crianças e países em desenvolvimento (Boschi-Pinto et al., 2008; WHO, 2008, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o total de mortes de crianças menores de cinco anos em 2008 chegou a 8,8 milhões, sendo três milhões causadas por diarréia e pneumonia, especialmente em regiões com baixo nível socioeconômico (WHO, 2010).

Como agentes etiológicos de gastroenterites infecciosas, os vírus e as bactérias representam as mais importantes morbidades. Embora a prevalência dos agentes infecciosos virais nas gastroenterites seja similar entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, no que diz respeito aos agentes infecciosos bacterianos, a prevalência e o tipo variam conforme as condições de saneamento básico, de higiene da população e a área geográfica do estudo. Dentre os principais agentes etiológicos bacterianos, os patotipos de *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) figuram como problemas de saúde significativos quando se fala em gastroenterite infantil em países em desenvolvimento.

Os patotipos de DEC são constituídos por cepas de *E. coli* que apresentam mecanismos diversificados de virulência, que permite identificá-las e classificá-las em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica ou produtora de toxina de Shiga (EHEC ou STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998). O patotipo EPEC é subdividido em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC) com base na presença do plasmídio EAF (EPEC adhrerence factor) nas tEPEC e ausência deste nas aEPEC. Dentre os patotipos, a EAEC, considerada um patógeno emergente, e a DAEC são constituídas por cepas com características heterogêneas e participação controversa na gênese da diarréia, evidenciando a importância da realização de estudos caso-controle. No Brasil a EIEC é encontrada em baixa freqüência, enquanto a EHEC é incomum; a tEPEC é descrita em frequência decrescente, ao contrário do observado para aEPEC que, assim como em países desenvolvidos, vem apresentando freqüência significativa; enquanto que a ETEC, é freqüente em regiões em

desenvolvimento. Com exceção da EHEC, a prevalência dos diversos patotipos de DEC no Brasil tem acompanhado a dos países desenvolvidos.

A identificação das DEC depende de métodos fenotípicos, como testes de aderência e invasão em células cultivadas *in vitro*, testes de toxigenicidade e de métodos moleculares, como o teste de hibridização de colônias e a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que são restritos a laboratórios de pesquisa, limitando desta forma o conhecimento da participação dos diversos patotipos na gênese da diarréia.

Em regiões fortemente associadas à pobreza e a precárias condições sanitárias, os agentes bacterianos, especialmente os patotipos de DEC, ganham destaque como causadores de diarréia infantil. No Estado do Espírito Santo existem Comunidades Quilombolas entre os eucaliptais, canaviais e pastos, diversas destas localizadas nos municípios de São Mateus e Conceição da Barra, formadas, em sua maioria, por casas construídas de pau-a-pique, desprovidas de esgoto e caracterizadas pelo uso de cisternas para armazenagem de água da chuva, tornando as condições favoráveis à disseminação de DEC.

Portanto, tendo em vista o relevante papel dos patotipos de DEC como agente etiológico nas doenças diarréicas, principalmente em regiões carentes e subdesenvolvidas, tratou-se esta pesquisa de um estudo caso-controle, com o objetivo de determinar a prevalência dos diversos patotipos de DEC isolados de fezes de crianças quilombolas do Norte do Espírito Santo, com e sem diarréia, a fim de estimar a ocorrência na região do estudo e participação de cada um deles na diarréia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONCEITOS GERAIS E ETIOLOGIA INFECCIOSA DAS DIARRÉIAS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) conceitua “diarréia" como uma alteração de hábito intestinal caracterizada por aumento do número de evacuações e/ou diminuição da consistência das fezes devido à presença de água e eletrólitos. Também segundo a OMS, diarréia aguda é a alteração repentina do hábito intestinal, caracterizada pela ocorrência de evacuações líquidas em três ou mais episódios em 24 horas, ou uma única semi-líquida contendo muco e sangue em 12 horas. A duração desta não deve exceder o prazo de 15 dias (WHO, 1988).

A diarréia é importante causa de morbidade e mortalidade infantil principalmente quando se considera regiões de baixo nível socioeconômico, onde em diversas delas, é evidente a deficiência em saneamento básico. Esse distúrbio intestinal é a terceira maior causa de morte de crianças menores de cinco anos em todo mundo, sendo responsável por 1,87 milhões de mortes por ano, 80% ocorrem em países em desenvolvimento (Boschi-Pinto et al., 2008).

O grau de desenvolvimento de um país está relacionado, dentre outras variáveis, à disponibilidade de água potável, saneamento básico, acesso aos serviços de saúde e estado nutricional. Estes aspectos estão intimamente ligados à incidência da diarréia em países em desenvolvimento, onde há alta prevalência de alguns dos mais de 20 patógenos intestinais dentre os de etiologia viral, bacteriana e parasitária, em especial, os de natureza bacteriana (Kitagawa et al., 1989; Almeida et al., 1998; Waters et al*.,* 2000; Eliott, 2007; Hotez et al., 2009; Harhay et al., 2010; Walker et al., 2010). Entre os patógenos bacterianos mais importantes destacam-se os patotipos de *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC), *Shigella*, *Salmonella, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolitica* (Kitagawa et al., 1989; Almeida et al., 1998; Walker et al., 2010). Dentre os principais agentes infecciosos virais têm-se os rotavírus; adenovírus; norovírus e astrovírus, além dos emergentes bocavírus, parechovírus e aichivírus, merecendo destaque os rotavírus e norovírus (Waters et al*.,* 2000; Eliott, 2007). Os parasitas encontrados no trato gastrointestinal humano podem ser categorizados em protozoários, representados principalmente pela *Giardia spp, Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp, e em helmintos, como

Ascaris lumbricoides, *Ancylostoma duodenale* e *Tricuris trichiura*, todos estes transmitidos pelo solo. Estima-se que 1/6 da população mundial esteja infectada por estes parasitas (Hotez et al., 2009; Harhay et al., 2010). Dentre estes diversos patógenos intestinais, somente a *E. coli* será abordada nas seções seguintes por se tratar do tema deste estudo.

2.2 ORIGEM DAS COMUNIDADES QUILOMBOLAS

No período de escravidão no Brasil (séculos XVII e XVIII), os negros que conseguiam fugir de engenhos de cana-de-açúcar, de fazendas e pequenas propriedades, onde executavam diversos trabalhos braçais, formavam pequenos vilarejos chamados de quilombos, locais bem escondidos e fortificados no meio das matas (Bueno, 2003). Na época colonial, o Brasil chegou a ter centenas de comunidades quilombolas espalhadas e representaram uma das formas de resistência e combate à escravidão (Bueno, 2003). Rejeitando a cruel forma de vida, os negros buscavam a liberdade e uma vida com dignidade, resgatando a cultura e a forma de viver que deixaram na África e contribuindo para a formação da cultura afro-brasileira (Bueno, 2003).

Atualmente, de acordo com o Decreto 4.887 editado no dia 20 de novembro de 2003, os remanescentes das Comunidades Quilombolas são definidos como grupos étnico-raciais com trajetória histórica própria, dotados de relações territoriais específicas, com presunção de ancestralidade negra relacionada com a resistência à opressão histórica sofrida.

Mais de duas mil comunidades quilombolas espalhadas pelo território brasileiro mantêm-se vivas e atuantes, lutando pelo direito de propriedade de suas terras consagrado pela Constituição Federal desde 1988 (http://pt.wikipedia.org/wiki/Quilombola). No Estado do Espírito Santo as Comunidades quilombolas se encontram distribuídas nas regiões Sapê do Norte, compreendidas pelos municípios de Jaguaré, Conceição da Barra e São Mateus, no Centro e no Sul do Estado.

2.3 *Escherichia coli*

2.3.1 Características do gênero e espécie

A *Escherichia* é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae,* constituída por bacilos gram negativos, anaeróbios facultativos, oxidase negativos, catalase positivos, que reduzem nitrato em nitrito e são fermentadores de glicose. Estes microorganismos podem ser classificados conforme suas estruturas antigênicas de superfície: (i) antígeno somático (AgO), formado por unidades repetidas de três-cinco hexoses; (ii) antígeno flagelar (AgH) e; (iii) antígeno capsular (AgK). Com a descoberta de diferentes estruturas moleculares, incluindo fímbria, o então antígeno K, passou a ser designado de polissacarídios ácidos, enquanto os antígenos fimbriais foram inseridos entre os antígenos F (Edwards & Ewing, 1972; Orskov et al., 1982; Lior, 1996). Uma combinação específica dos antígenos O e H definem o "sorotipo" da cepa isolada, enquanto apenas a determinação do antígeno O define o "sorogrupo" (Nataro & Kaper, 1998).

Existem seis espécies descritas de *Escherichia*: *E. coli*, *E. blattae*, *E fergussonii*, *E vulneris*, *E. albertii* e *E. hermannii*, sendo a *E. coli* a espécie mais comumente isolada (Farmer, 1999; Huys et al., 2003). A *E. coli*, em sua maioria, caracteriza-se como fermentadora de lactose e de sacarose, produtora de gás de glicose, utilizando a via de fermentação ácida mista para o metabolismo do piruvato formado pela fermentação da glicose; motilidade positiva ou negativa, com a maioria das cepas sendo móveis; lisina descaboxilase positiva ou negativa e incapaz de utilizar citrato de sódio como única fonte de carbono por não possuir a enzima citratase (Koneman et al., 2006).

A espécie *E. coli* é capaz de colonizar o trato gastrintestinal humano já nas primeiras horas de vida, mantendo uma relação de benefício mútuo com o seu hospedeiro. Entretanto, cepas altamente adaptadas, resultantes da aquisição de fatores específicos de virulência, codificados por genes transferíveis ou não, proporcionaram algumas combinações genéticas bem sucedidas, conferindo às cepas de *E. coli* a capacidade de causar doenças em indivíduos saudáveis, conforme descrito por Kaper et al. (2004). Em geral, três síndromes clínicas podem resultar de infecções

associadas às linhagens patogênicas de *E. coli*: (i) infecções intestinais, (ii) infecções no trato urinário e (iii) sepse/meningite (Trabulsi et al., 2005).

As cepas de *E. coli* causadoras de infecções intestinais, designadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC), apresentam diferentes mecanismos de virulência e patogênese (posteriormente descritos), o que permite identificá-las e classificá-las em: (i) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), (ii) *E. coli* enteroinvasora (EIEC), (iii) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), (iv) *E. coli* enterohemorrágica ou produtora de toxina de Shiga (EHEC ou STEC), (v) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e, (vi) *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998; Schmidt, 2010) demonstrado na Figura 1. Além destas, *Cell Detaching E. coli* (CDEC) é apontada como um possível novo patotipo de DEC (Clarke, 2001; Abduch et al., 2002).

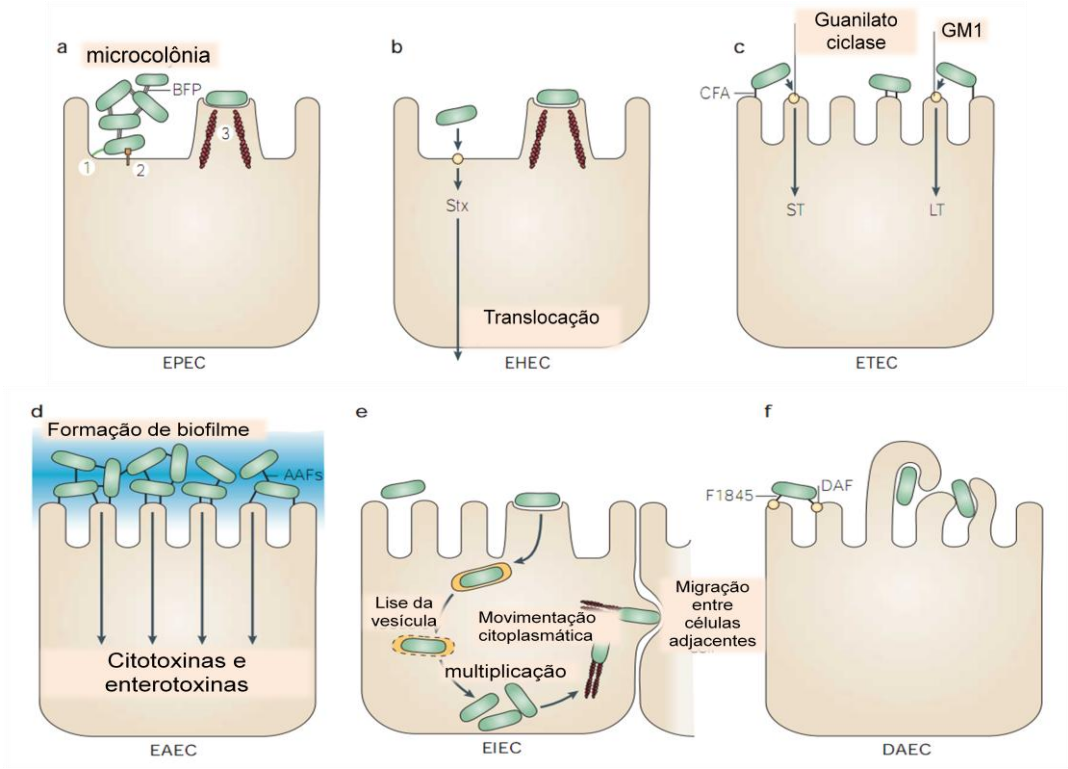

Figura 1. Esquema simplificado da patogênese dos patotipos de *E. coli* diarreiogênica. Fonte: Kapper et a. (2004), adaptado.

2.3.2 Breve descrição, patogênese e epidemiologia dos patotipos de DEC

2.2.2.1 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

A EPEC foi o primeiro patotipo descrito e associado à diarréia infantil (Bray, 1945; Giles & Sangster, 1948; Taylor et al., 1949; Kauffmann & DuPont, 1950; Edelman & Levine, 1983), desde então, tem sido relatado como o principal agente etiológico de diarréia em crianças menores de um ano de idade. Em 1987 a Organização Mundial de Saúde classificou como EPEC amostras pertencentes aos seguintes sorogrupos de *E. coli*: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (World health organization, 1987). A participação dos principais sorotipos de EPEC na gênese da diarréia, demonstrada por estudos em voluntários (Levine et al. 1978; Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi et al., 2002), teve início da elucidação dos mecanismos de virulência a partir da década de 80 (Levine & Eldman, 1984; Levine et al., 1985, 1987).

Os fatores de virulência localizados em regiões cromossômicas, como é o caso dos genes presentes em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), e plasmidiais, representado pelo plasmídio EAF (EPEC *Adherence Factor*), responsável por codificar a fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) (Figura 2). Durante o segundo simpósio sobre EPEC realizado em 1995 em São Paulo, esse patotipo foi subdividido em EPEC “típica” (tEPEC) e “atípica” (aEPEC) conforme a presença ou ausência do plasmídio EAF, respectivamente (Kaper, 1996; Vallance & Finlay, 2000; Chen & Frankel, 2005; Schmidt, 2010). A perda deste plasmídio, resulta em diferenças entre estes dois patotipos no fenótipo de aderência em células HEp-2 e/ou HeLa, com a tEPEC exibindo padrão AL (Aderência Localizada), enquanto a aEPEC, o padrão ALL (Aderência localizada like) (Scaletsky et al., 1996). As peculiaridades destes patógenos não se restringem a este aspecto. Em geral, as tEPEC são mais homogêneas em seus fatores de virulência, majoritariamente codificados pela região LEE e plasmídio EAF, quando comparadas à aEPEC, que podem expressar fatores como EAST-1 (enterotoxina termoestável) dentre outros, que não são codificados pela região LEE (Trabulsi et al., 1996, 2002; Ito et al., 2007).

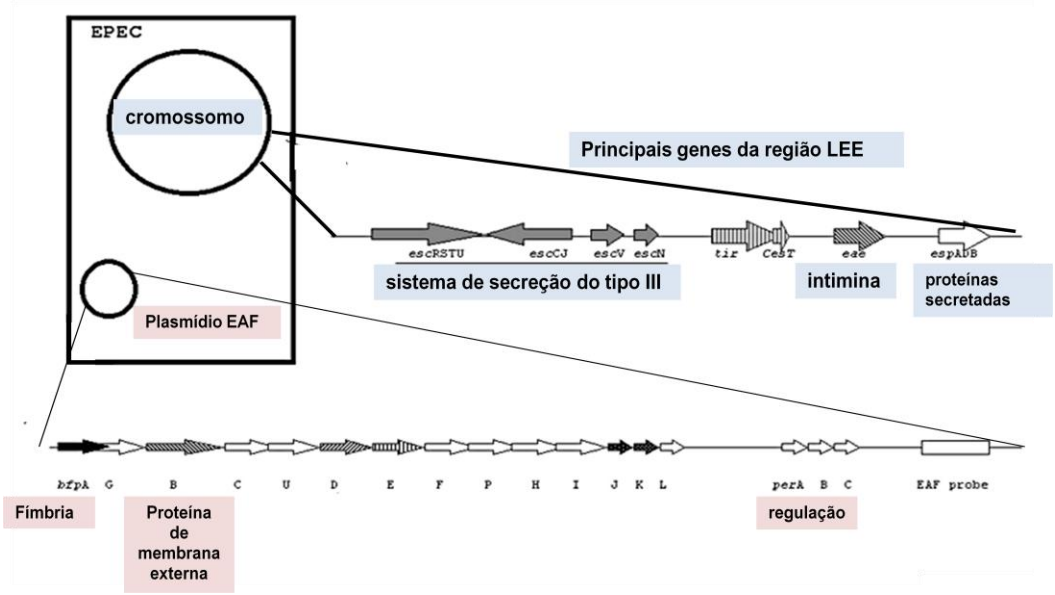

Figura 2. Genes envolvidos na patogênese da EPEC. Genes cromossômicos de virulência representados pela região LEE, responsáveis por codificar o sistema de secreção do tipo III, tir, intimina e proteínas efetoras secretadas. O plasmídio EAF codifica a fímbria BFP e proteína reguladora da transcrição da região LEE. Fonte: Nataro & Kaper (1998) adaptado.

É preciso destacar também que aspectos epidemiológicos são distintos para estes patógenos. Enquanto as cepas de tEPEC estão associadas a infecções em crianças menores de um ano e não são descritas em outros reservatórios diferentes do homem, as cepas de aEPEC estão associadas a infecções tanto em crianças como em adultos e são encontradas em diferentes espécies de animais (Gyles, 1994; Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi et al., 2002).

Os sorotipos de aEPEC podem pertencer ou não aos chamados sorogupos clássicos de EPEC (Campos et al., 2004), e diferem dos sorotipos de tEPEC basicamente pelos antígenos H. Os sorotipos mais encontrados nos dois grupos de EPEC são demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1. Principais sorotipos isolados das cepas de EPEC típica e atípica. Fonte: Trabulsi et.al. (2002).

EPEC	Sorotipos
Típica	O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34
Atípica	O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2

O modelo proposto de patogênese da EPEC propõe três etapas. A primeira refere-se à aderência inicial, envolvendo a participação do filamento EspA (*EPEC secreted proteins A*), intimina e BFP, este no caso da EPECt (Cleary et al., 2004). A segunda etapa compreende a produção e translocação de proteínas como as do grupo Esp (*EPEC secreted proteins*) e Tir (*translocated intimin receptor*), através de um sistema de secreção de proteínas, denominado de Sistema de Secreção do Tipo III (*Type Three Secretion System* - TTSS), codificado pela região LEE. Depois de translocada ao citoplasma, Tir é ancorada na membrana celular hospedeira, funcionando como receptor para a proteína intimina, localizada na superfície bacteriana (Kenny et al., 1997; Sal-Man et al., 2009; Capellone, 2010). A porção de Tir exposta no citosol sofre uma fosforilação no resíduo de tirosina, permitindo sua ligação à proteína adaptadora Nck, que por sua vez recruta proteínas regulatórias de actina N-WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome*) e Arp2/3 (*actin-related protein*), levando à formação de um complexo protéico capaz de realizar a polimerização dos filamentos de actina, subjacente à bactéria aderida (Kalman et al., 1999, Kaper et al., 2004) (Figura 3).

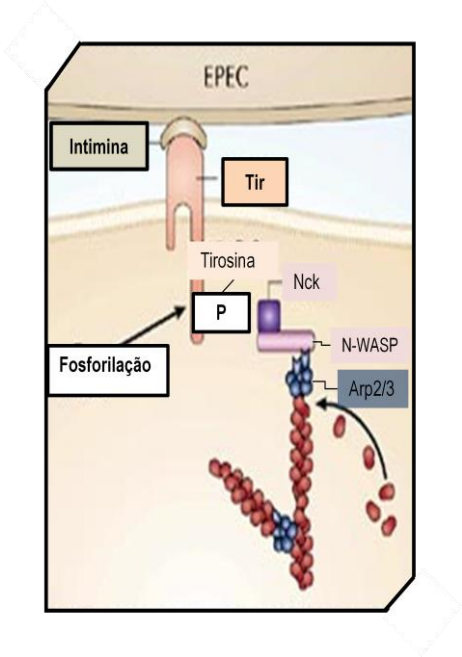

Figura 3. Modelo da transdução de sinal envolvida na lesão A/E desencadeada pela ligação de *E. coli* enteropatogênica em superfície de enterócito. O esquema mostra como a EPEC utiliza duas proteínas, Tir e intimina, para alteração do sistema de sinalização da célula hospedeira. A fosforilação de Tir permite a ligação de Nck que ativa a proteínas regulatórias de actina, N-WASP e Arp 2/3, que passam a estimular a polimerização de actina. Fonte: Hayward et al., (2006), adaptado.

A terceira etapa relaciona-se com a formação do pedestal, alteração histopatológica denominada de lesão *attaching and effacing* (A/E), conferida pela aderência íntima da bactéria na superfície epitelial com destruição das microvilosidades da célula hospedeira, comprometendo a capacidade absortiva e digestiva do enterócito (Nataro & Kaper,1998; Vallance & Finlay, 2000; Chen & Frankel, 2005; Garmendia et al., 2005).

Além de todas estas modificações descritas, a ativação de uma resposta inflamatória com o recrutamento de leucócitos para o epitélio intestinal aponta para um mecanismo multifatorial, contribuindo com aumento da permeabilidade intestinal, destruição das microvilosidades e conseqüente perda de capacidade absortiva (Kaper et al., 2004).

2.3.2.2 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

A ETEC é um importante patotipo associado à diarréia infantil em regiões endêmicas (países em desenvolvimento) e é a principal causa da diarréia dos viajantes (Black, 1990; Qadri et al., 2005). Constituída por cepas que infectam homens e animais, é caracterizada pela produção das enterotoxinas termo-lábil (LT) e/ou enterotoxina termoestável (ST). A toxina LT, do tipo A/B e imunogênica, é dividida em dois subgrupos, LT-I e LT-II. A LT-I é encontrada em cepas de *E. coli* patogênicas tanto para humanos (LTh-I) como para animais (LTp-I); a LT-II é encontrada em cepas isoladas de animais e raramente encontrada nas isoladas de humanos. A LT-I, que apresenta similaridade com a toxina colérica quanto à sua estrutura e ao mecanismo de ação, é composta de cinco subunidades B idênticas arranjadas em anel e uma subunidade central A (Dallas & Falkow, 1980; Gyles, 1992; Spangler, 1992). As subunidades B são responsáveis pela ligação da enterotoxina ao receptor no enterócito e internalização, enquanto a subunidade A possui a atividade enzimática da toxina. A enterotoxina ST, não imunogênica, é subdividida nas classes STa e STb, que apresentam diferenças estruturais e em seus mecanismos de ação. Apenas a toxina da classe STa tem sido associada à doença em humanos (Nataro & Kaper, 1998).

A patogênese descrita para ETEC inicia-se através de sua aderência às células da mucosa do intestino delgado por estruturas denominadas fatores de colonização (CFA), sendo descritos mais de 20 CFA distintos em ETEC de origem humana (Evans et al.,1978; Levine, 1981; Blanco et al., 1991; Wolf, 1997; Torres et al., 2005). Após a colonização da mucosa do intestino delgado, a ETEC sintetiza e secreta as enterotoxinas, LT e/ou ST, que são capazes de provocar o aumento da secreção intestinal, levando ao quadro diarréico, conforme descrito a seguir.

A LT é reconhecida pelo receptor GM1 localizado na membrana do enterócito por meio de suas subunidades B, é endocitada e transportada ao Complexo de Golgi, onde ocorre clivagem da subunidade A dando origem aos peptídeos A_1 e A_2, tendo o primeiro, atividade de ADP-ribosil transferase, que ADP-ribosila a subunidade alfa da proteína reguladora G, levando à ativação da adenilato sintetase, e consequente aumento nos níveis de AMP cíclico (AMPc) (Fukuta et al, 1988). Diante desse desequilíbrio nos níves de AMPc, proteínas dependentes de cinases são ativadas,

ocorrendo a fosforilação de canais de cloreto localizados na membrana apical do enterócito, culminando na secreção de íons cloreto pelas células das criptas intestinais e inibindo a absorção de sódio pelas células do topo das vilosidades (Gill & Richardson, 1980).

O mecanismo pelo qual a ST leva ao acúmulo de água e eletrólito no lúmen intestinal é atribuído à ativação da guanilato ciclase, receptor enzimático localizado na membrana apical da célula intestinal, que ocasiona o aumento dos níveis de GMP cíclico no citoplasma da célula, estimulando a secreção de cloreto e inibindo a absorção de cloreto de sódio (Rao, 1985).

2.3.2.3 *E. coli* enteroinvasora (EIEC)

A EIEC foi descrita como causadora de diarréia pela primeira vez em 1971 através de estudos em voluntários (DuPont et al., 1971). Está intimamente relacionada à enterobactéria *Shigella* spp*.* em aspectos bioquímicos (como não fermentadoras de lactose e imóveis), genéticos e em mecanismos causadores da diarréia (Parsot, 2005; Peng et al., 2009).

Este patotipo é capaz de invadir o epitélio intestinal e elaborar enterotoxinas, que são responsáveis pelo desenvolvimento da doença, compreendendo as seguintes etapas: (i) penetração nos enterócitos, (ii) lise do endossomo, (iii) multiplicação intracelular, (iv) movimentação intracitoplasmática direcionada e, (v) migração basolateral pelas células epiteliais (Goldeberg & Sansonetti, 1992; Nataro & Kaper, 1998).

A participação de proteínas como as Ipa (Ipa A, IpaB, IpaC e IpaD), codificadas por genes plasmidiais de invasividade denominados *pInv* e translocadas através do TTSS para a célula hospedeira, VirA e a proteína denominada de VirG ou IcsA (Proteína de invasão celular) possibilitam a invasão e disseminação da bactéria pelas células do hospedeiro (Egile et al., 1999; Ogawa et al., 2008; Schroeder & Hilbi, 2008; Croxen & Finlay, 2010). As proteínas IpaB e IpaC são inseridas na membrana celular hospedeira formando um poro, enquanto VirG é distribuída na superfície da EIEC, formando um polo com função de polimerização de actina,

recrutando outras proteínas como vinculina e N-WASP, através da ligação dos repetidos resíduos de glicina presentes na sua superfície exposta (Suzuki et al., 1998; Egile et al., 1999; Ogawa et al., 2005; Yoshida et al., 2006). Além disso, a participação da proteína Cdc42 (Proteína de controle de divisão celular), facilitadora da formação do complexo VirG-N-WASP, é capaz de ativar o complexo Arp2/3 e levar a uma rápida polimerização dos filamentos de actina (Hale et al., 1985; Baudry et al., 1987; Andrews et al., 1991; Menard et al.,1993; Allaoui et al., 1995; Rohatgi et al., 1999; Prehoda et al., 2000; Marchand et al., 2001). Por último e não menos importante, VirA atua no outro pólo da célula bacteriana, despolimerizando actina, constituinte do citoesqueleto celular (Figura 4) (Kaper et al., 2004). Dessa forma, há a formação de polimerização em um polo e em outro de despolimerização de actina na superfície bacteriana, responsável pela extensão e movimentação intracitosplasmática da bactéria pelo citosol, contribuindo para migração do enteropatógeno no sentido basolateral (Sansonetti, 1992; Vasselon et al., 1992; Adam et al., 1995; Nataro & Kaper, 1998).

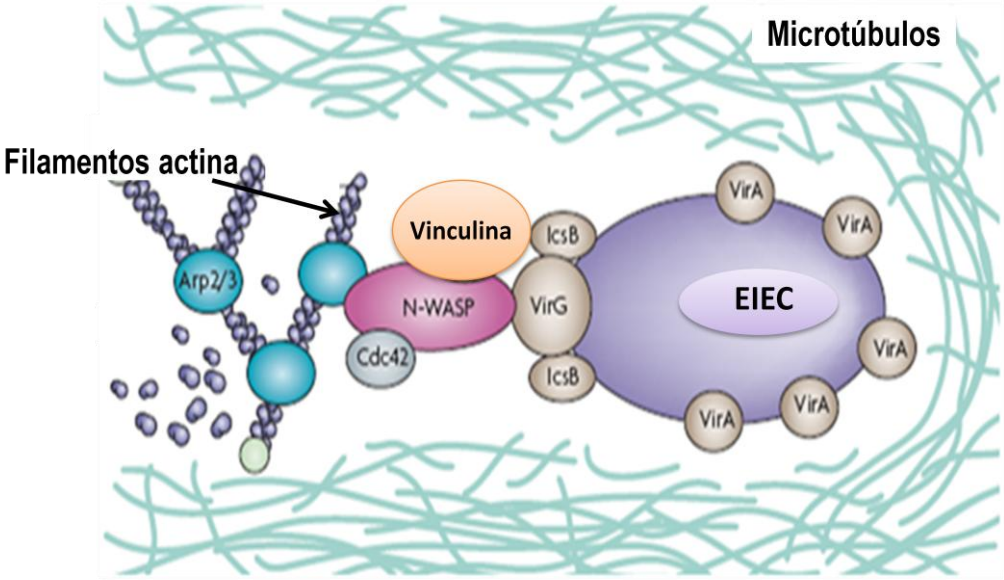

Figura 4. Esquema da migração basolateral de *E. coli* enteroinvasora. A figura mostra VirG na superfície bacteriana, essencial na migração da EIEC no enterócito. O acúmulo de VirG no polo da bactéria recruta e ativa o complexo formado Arp 2/3 pela interação entre VirG-N-WASP. VirA tem capacidade de destruir os microtúbulos facilitando a movimentação do microorganismo. Fonte: Ogawa et al. (2008), adaptado.

Este patotipo, semelhante à *Shigella*, causa disenteria bacilar caracterizada por fezes com sangue, pus e muco, presença de sinais e sintomas como tenesmo e febre em crianças e adultos (Snyder et al., 1984; Taylor et al., 1988). Porém, a maioria dos pacientes acometidos por EIEC apresentam um quadro diarréico caracterizado por fezes aquosas. Relatos de surtos envolvendo o patotipo são geralmente relacionados à transmissão de água e/ou alimentos contaminados (Snyder et al., 1984; Gordillo et al., 1992), embora a transmissão também possa ocorrer pelo contato pessoa a pessoa (Nataro & Kaper, 1998).

2.3.2.4 *E. coli* enteroemorrágica (EHEC)

O patotipo EHEC foi evidenciado pela primeira vez em 1983, quando epidemiologistas investigaram dois surtos de colite hemorrágica associados ao consumo de hambúrguer e de síndrome hemolítica urêmica com isolamento de amostras de *E. coli* do sorotipo O157:H7 (Karmali et al., 1983; Riley et al.,1983).

Este patotipo possui duas designações, STEC e EHEC; a primeira refere-se a cepas de *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (S*higella dysenteriae*), e a segunda correspondente ao subgrupo de sorotipos de STEC que além de produzir essa toxina é capaz de causar a lesão A/E (Nataro & Kaper, 1998; Croxen & Finlay, 2010). Os principais sorotipos de EHEC conhecidos são O26:H11, O103:H2, O111ac:H8; O118:H16, O145H28 e O157:H7 (Brooks et al., 2005; Sodona et al., 2008).

Esses patógenos se constituem em zoonose, podendo ser encontradas na microbiota intestinal de diversos animais como em bovinos, suínos, gatos, cães, galinhas, caprinos, gaivotas e animais selvagens (Paton & Paton, 1998; Caprioli et al., 2005). O gado bovino é o principal reservatório para infecção de humanos, favorecendo surtos associados ao consumo de hambúrgueres mal cozidos, leite não pasteurizado; além disso, verduras, frutas, cidra e água podem ser contaminadas com fezes de animais contendo EHEC e servem como veículos de transmissão. O contato pessoa a pessoa dissemina a infecção para casos secundários (Nataro & Kaper, 1998). A dose infecciosa é baixa, variando entre 100 a 200 unidades

formadoras de colônia (UFC), semelhante ao número estimado para infecção por *Shigella* spp. (Bell et al., 1994).

As cepas de EHEC são caracterizadas pela presença da região LEE, funcionalmente idêntica à da EPEC, e pela produção de toxinas que fazem parte da família de toxinas Stx (*Shiga Toxin*), do tipo A/B, denominadas Stx1, Stx2, Stx2c e Stx2e (Paton & Paton, 1998). A EHEC pode expressar Stx1 e/ou Stx2, sendo a Stx1 imunologicamente idêntica a Stx produzida pela *Shigella dysenteriae* e a Stx2, somente relacionada (O'Brien & Holmes, 1987).

O modelo da patogênese proposto para a EHEC passa pelo processo de adesão, mediado pela intimina e pela proteína receptora Tir (translocada para membrana do enterócito) com formação de lesão A/E, semelhante ao processo descrito para EPEC. Apesar disso, há diferenças no acionamento da reorganização de actina em relação à proteína Tir, essencial para indução do sinal (Sal-Man et al., 2009).

Para a formação do pedestal na EHEC, a proteína EspFu (*E. coli secreted protein F-like from prophage U*), também conhecida como TccP (Tir-*cytoskeleton coupling protein*), embora não seja codificada pela região LEE, é injetada através no TTSS no citoplasma e recrutada por uma sequência de aminoácidos na porção C-terminal de EHEC-Tir (Allen-Vercoe et al., 2006; Campellone et al., 2006; Schmidt, 2010). Aparentemente, EspFu ativa N-WASP pela sua ligação direta ao segmento inibitório desta proteína, que por sua vez ativa Arp2/3, com conseqüente polimerização da actina no local da aderência da EHEC (Sallee et al., 2008; Campellone, 2010).

Com a multiplicação dos patógenos, ocorre a produção da toxina Stx e sua translocação para corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, a subunidade B da toxina poderá ser reconhecida por receptores Gb3, que estão associados a colesterol e a receptores GM1 nas hemácias, onde são transportadas, e nas membranas lipídicas móveis denominadas de "*lipid rafts*", presentes nas membranas celulares de endotélio da microvasculatura renal e cerebral, colón e plaquetas, e internalizada por essas células (Cooling et al., 1998; Kovbasnjuk et al., 2001). Além disso, sabe-se que Stx1 e Stx2 estimulam a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF-α), Interleucina 1 (IL-1) e 6 (IL-6), contribuindo para super-expressão dos receptores Gb3, principalmente nos rins,

cérebro, dentre outras microvasculaturas (Peter et al., 2002). A ação enzimática da toxina é atribuída à subunidade A, que possui ação de N-glicosidase, removendo um resíduo de adenina da molécula de RNA ribossômico 28S, impedindo a síntese protéica e levando à morte celular (Boyd & Lingwood**,** 1989; Melton-Celsa & O'Brien, 1998). Portanto, as manifestações clínicas da doença, colite hemorrágica e a sídrome hemolítica urêmica, são proporcionadas pela ação da Stx sobre o endotélio vascular, causando hemorragias no cólon e obstrução da microvasculatura glomerular, respectivamente (Kaper et al., 2004).

2.3.2.5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

A EAEC está associada à diarréia em crianças e adultos, tanto em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento. Apesar de estar mais frequentemente envolvido nos casos de diarréia persistente, o patotipo também é descrito em alguns estudos como possível responsável por casos esporádicos e por surtos em todo o mundo (Fang et al., 1995; Kaper et al., 2004; Vu Nguyen et al., 2006; Weintraub, 2007). Descrita pela primeira vez em 1987, a EAEC é caracterizada pelo padrão AA em cultura de células HEp-2, conforme anteriormente descrito (Nataro & Kaper, 1998; Nataro, 2005). Este fenótipo está relacionado aos genes localizados em um plasmídio denominado pAA *(plasmid Aggregative Adherence*), onde está contido um gene regulador *aggR* (*aggregative Regulator*), que é capaz de controlar um grupo de genes plasmidiais como os que codificam as fímbrias AAF (*Aggregative Adherence Fimbriae*), AAF/I, AAF/II e AAF/III, além de dispersina e, por pelo menos duas ilhas de patogenicidade cromossômicas (Nataro et al., 1992; Nataro et al., 1994; Czeczulin et al., 1997; Bernier et al., 2002; Okhuysen & DuPont, 2010). A presença ou ausência de *aggR* é utilizada como critério de classificação das cepas EAEC, em típica e atípica, respectivamente (Nataro et al., 2005).

A EAEC é reconhecida pela heterogeneidade de suas cepas e por seus numerosos e prováveis fatores de virulência (Elias et al., 2002). Apesar disso, as implicações desses fatores nos sintomas e nas manifestações clínicas permanecem obscuras. Entre as toxinas melhor descritas, tem-se: (i) Pet (*Plasmid-Encoded Toxin*), proteína autotransportadora com função de enterotoxina termo-estável e de citotoxina, que

induz rompimento do citoesqueleto da membrana e na rede de actina do citoesqueleto celulares (Dutta et al., 2002) e; (ii) EAST1 (*EAEC Heat-Stable*-1), relacionada com a toxina termoestável ST da ETEC, que é capaz de alterar os níves de GMP cíclico nos enterócitos (Menard & Dubreuil, 2002). Pode-se destacar também duas proteínas extracelulares: (i) Pic (*Protein Involved in Intestinal colonization*), serina protease autotransportadora com atividade de mucinase (Henderson et al., 1999) e; (ii) dispersina, responsável por mediar a dispersão da EAEC na mucosa intestinal colaborando com o espalhamento da infecção (Sheikh et al., 2002).

Sua patogênese é complexa. Na etapa inicial ocorre a aderência da EAEC à mucosa intestinal por fimbrias AAF, composta por três subunidades, AAF/I, AAF/II e AAF/III e/ou outras adesinas (Nataro et al., 1992; Czeczulin et al., 1997; Bernier et al., 2002; Moreira et al., 2003). Na segunda etapa, a multiplicação continuada da bactéria promove um estímulo na produção de muco na superfície dos enterócitos, com formação de biofilme bacteriano. A terceira etapa envolve a produção de toxinas, início de uma resposta inflamatória e secreção intestinal, desencadeando a diarréia, em virtude das lesões na mucosa e de má-absorção intestinal (Harrington et al., 2005; Nataro et al., 2005).

É importante dizer que as infecções por EAEC em crianças, principalmente em menores de cinco anos, podem representar um fator agravante para o estado nutricional destes indivíduos, pelo fato do patotipo ser caracterizado pela formação de um espesso biofilme e pelo aumento da secreção de muco pelo epitélio intestinal (Nataro & Kaper, 1998), que possibilitaria uma prolongada colonização e episódio diarréico persistente (Weintraub, 2007).

2.3.2.6 *E. coli* de aderência difusa (DAEC)

A DAEC foi assim denominada com base no padrão de adesão difusa (AD) a células HeLa ou HEp-2 (Scaletsky et al., 1984), e pela ausência de marcadores de virulência típicos de outros patotipos de DEC (Nataro & Kaper, 1998).

A DAEC é reconhecida como o sexto patotipo de DEC, sendo constituído por cepas muito heterogêneas (Jallat et al., 1993; Czeczullin et al., 1999; Lopes et al., 2005). Este patotipo apresenta dois possíveis fatores de virulência responsáveis pelo fenótipo AD. O primeiro deles é a adesina fimbrial F1845, caracterizado na cepa padrão C1845 e cujos genes são encontrados tanto no cromossomo bacteriano como em plasmídio (Bilge et al., 1989; Yamamoto et al., 1994). A proteína pertence à família de adesinas Dr, sendo encontradas em aproximadamente 75% das cepas de DAEC (Kaper et al., 2004). Essas adesinas usam como receptor o DAF (*decay-accelerating factor*) que normalmente protege as células do sistema complemento (Bernet-Camard et al.,1996; Peiffer et al.,1998; Hasan, 2002). O segundo possível fator de virulência é uma proteína de membrana externa designada de AIDA-I (Benz & Schmidt, 1989).

Apesar de não estar totalmente estabelecida a patogênese, sabe-se que as cepas de DAEC produzem efeitos citopáticos caracterizados por longas extensões celulares (Yamamoto et al., 1994). Essas projeções parecem envolver a bactéria, mas sem a completa internalização, sendo capaz protegê-la da ação de antimicrobianos e do sistema imune do hospedeiro (Nataro & Kaper, 1998).

O papel da DAEC na diarréia tem se mostrado controverso, sendo reportada em alguns estudos em freqüência semelhante tanto nas amostras de origem diarréica como nos controles (Nataro et al., 1985; Cravioto et al., 1991; Magalhães et al., 1992; Araujo et al., 2007), enquanto outros, mostram a associação do patotipo à diarréia (Rosa et al., 1998; Scaletsky et al., 2002; Spano et al., 2008; Ochoa et al., 2009).

2.3.3 Isolamento e identificação de DEC

A *E. coli,* assim como outras espécies e/ou gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae,* é identificada por reações bioquímicas convencionais ou por testes automatizados. Entretanto, para determinação de cada patotipo de DEC, torna-se necessário o uso de métodos fenotípicos e/ou moleculares, que serão descritos a seguir.

2.3.3.1 Método Fenotípico

2.3.3.1 Teste de adesão a células HeLa ou HEp-2

Um dos testes fenotípicos mais utilizados na detecção de DEC é o teste de adesão a células HeLa ou HEp-2 cultivadas *in vitro*. As cepas de EPEC, EAEC e DAEC são patotipos que apresentam padrões distintos e peculiares de aderência em cultura de células HEp-2 ou HeLa, o que possibilita a utilização desta metodologia para identificação destes microorganismos. Três padrões clássicos de aderência podem ser diferenciados: (i) aderência localizada (AL), formando microcolônias na superfície dessas células que é característico da tEPEC (Figura 5A); (ii) aderência difusa (AD), com distribuição uniforme sobre as células cultivadas, encontrado na DAEC (Figura 5B) e (iii) aderência agregativa (AA), tipo *stacked bricks* (como tijolos empilhados) na superfície das células e/ou na superfície de lamínula livre de células, caracterizando a EAEC (Figura 5C) (Scaletsky et al., 1984; Nataro et al., 1987). Além destes, dois outros padrões distintos, menos comuns, são observados: (i) aderência localizada-*like* (ALL), organizada em microcolônias mais frouxas que são visualizadas somente em períodos de ensaios mais prolongados, encontrado na maioria das amostras de aEPEC (Figura 5D); (ii) *Chain-Like Adhesion* (CLA), caracterizado pela formação de longos agregados em forma de cadeia, encontrado em algumas amostras de EAEC (Figura 5E) e (iii) *Cell-Detaching E. coli* (CDEC), diferenciado pelo descolamento das células HEp-2 ou HeLa aderidas a lamínulas (Gunzburg et al., 1993; Nataro et al., 1995; Gomes et al., 1998).

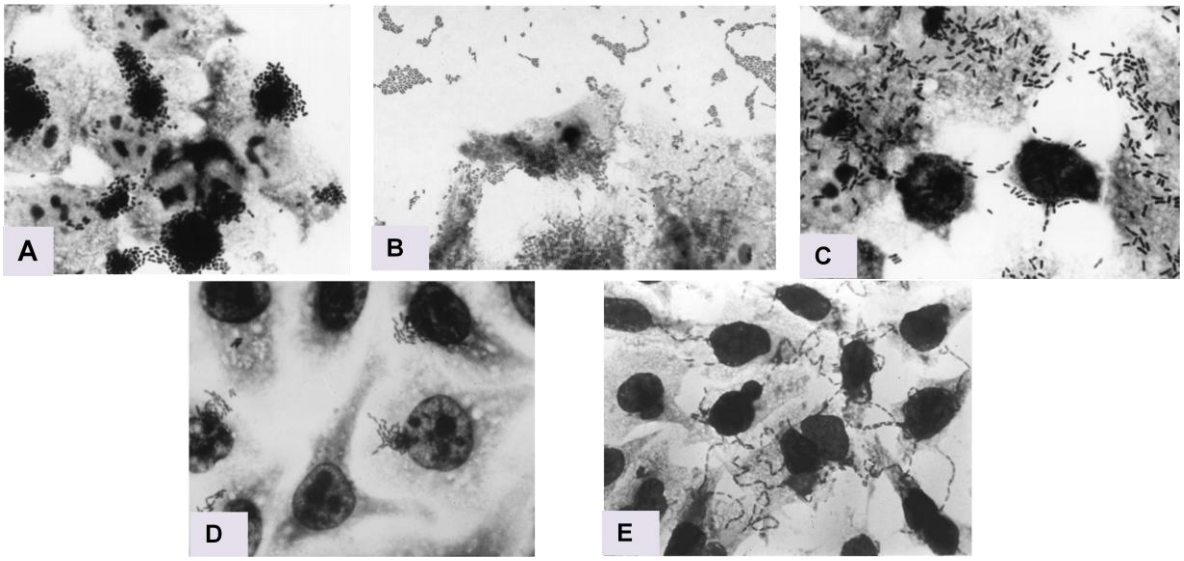

Figura 5. Padrão de adesão de *Escherichia coli* a células HEp-2. Microscopia de luz demonstrando padrões de aderência de cepas de *E. coli* em cultura de células HEp-2. A: aderência localizada (AL); B: aderência agregativa (AA); C: aderência difusa (AD); D: aderência localizada-like; E: aderência em cadeia (CLA). Fonte: Nataro & Kaper (1998); Gioppo et al. (1999); Scaletsky et al. (1999).

É importante considerar que mesmo com a evolução das técnicas de identificação conferida pelos avanços da biologia molecular, o teste de aderência continua sendo padrão ouro na identificação de EAEC e DAEC (Miqdady et al., 2002; Scaletsky et al., 2002), fato este justificado pela dificuldade de caracterização através de marcadores moleculares, os numerosos possíveis fatores de virulência e heterogeneidade das cepas pertencentes a estes dois patotipos (Elias et al., 2002; Le Bouguenec & Servin, 2006).

2.3.3.2 Métodos genotípicos

2.3.3.2.1 Teste de hibridização de colônias

O uso de sondas genéticas para a detecção dos genes das enterotoxinas LT e ST da ETEC revolucionou o estudo destes microorganismos (Moseley et al., 1982), substituindo os incômodos e trabalhosos ensaios com modelos animais. Desde então, as sondas genéticas têm sido introduzidas para todas as categorias de DEC. As sondas genéticas são segmentos específicos de DNA ou RNA de fita simples

gerados pela tecnologia do DNA recombinante no que diz respeito à detecção de patógenos (Gomes & Trabulsi, 1988). Esses segmentos podem ser utilizados para a pesquisa de sequências homólogas presentes no genoma de bactérias, vírus e em células eucarióticas em geral.

A caracterização e a classificação dos patotipos de DEC podem ser realizadas através do teste de hibridização de colônias (*colony blot*). Esta metodologia utiliza sondas de DNA, marcadas radioativamente com ^{32}P, com biotina ou com digoxigenina, para a pesquisa de genes de virulência (Tenover, 1988; Gicquelais et al., 1990). Os métodos não radioativos têm facilitado muito a utilização de sondas, especialmente em áreas onde o uso de radioisótopos é impraticável. Apesar disso, a hibridização com as sondas não radioativas são menos sensíveis que as radioativas, pois os oligonucleotídeos marcados, por exemplo, com digoxigenina, combinam com proteínas bacterianas dando uma coloração de fundo que dificulta a leitura quando a reação é fraca; enquanto que a principal desvantagem das sondas radioativas é a vida média curta dos isótopos.

O teste de hibridização de colônias é considerado um meio fidedigno para diferenciar amostras de DEC dos membros não patogênicos da microbiota normal, como também distinguir um patotipo de outro (Nataro & Kaper, 1998).

2.3.3.2.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um método genotípico largamente utilizado para identificação dos principais patotipos de DEC. Esta importante ferramenta de diagnóstico utiliza iniciadores específicos para amplificação dos genes cromossômicos e/ou plasmidiais respectivos aos patotipos de DEC.

A detecção da EPEC através do gene *bfpA* descrito por Gunzburg e colaboradores em 1995 (Gunzburg et al., 1995), o *screening* para o patotipo EAEC através da PCR para o plasmidio pCVD432 (Schmidth et al., 1995) e a detecção de EIEC pela pesquisa do gene *ipaH* (Sethabutr et al., 1992) são alguns dos importantes estudos que permitiram que a PCR fosse apresentada como uma alternativa rápida e

simplificada para a detecção dos principais patotipos de DEC. Além disso, outros avanços e aprimoramento da utilização do PCR foram observados, como o multiplex PCR para caracterizar os patotipos em duas reações, ou mesmo em uma única reação, pela detecção dos diversos genes correspondentes aos patotipos de DEC, com exceção da DAEC (López-Saucedo et al., 2003; Aranda et al., 2004, 2007; Garcia et al., 2011).

2.3.3.2.3 PCR em tempo real

A PCR em tempo real (*Real-time PCR*) representa a mais nova ferramenta para identificação dos patotipos de DEC. Trata-se de uma técnica baseada na PCR que amplifica além de poder quantificar, simultaneamente, um ou mais fragmentos específicos de DNA (Bellin et al., 2001). Estudos têm demonstrado ainda detecção de genes de virulência associados aos seis patotipos de DEC em um único ensaio, e ainda, um ganho significativo em seu custo-benefício utilizando *pool* de até cinco colônias por reação (Guion et al., 2008; Barletta et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência dos patotipos de *Escherichia coli* diarreiogênica isolados de fezes de crianças quilombolas, com e sem diarréia, de até doze anos de idade, provenientes de Comunidades Quilombolas pertencentes aos municípios de São Mateus e Conceição da Barra, Norte do Espírito Santo, entre agosto de 2007 a dezembro de 2009.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evidenciar patotipos de *E. coli* diarreiogênica através da pesquisa de genes de virulência por PCR monoplex e multiplex; e hibridização de colônia;
- Determinar EAEC e DAEC através do teste de adesão a células HEp-2;
- Evidenciar a prevalência dos patotipos de *E. coli* diarreiogênica em crianças com e sem diarréia;
- Analisar associação de patotipos de *E. coli* diarreiogênica com diarréia;
- Evidenciar infecções mistas e relacionar com diarréia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA ÁREA GEOGRÁFICA E POPULAÇÃO DO ESTUDO

As Comunidades Quilombolas contempladas pelo estudo estão localizadas no município de São Mateus e Conceição da Barra (Figura 6), região Sapê do Norte, com área de 2.543 km² e 1.188 km², respectivamente (IBGE, 2002).

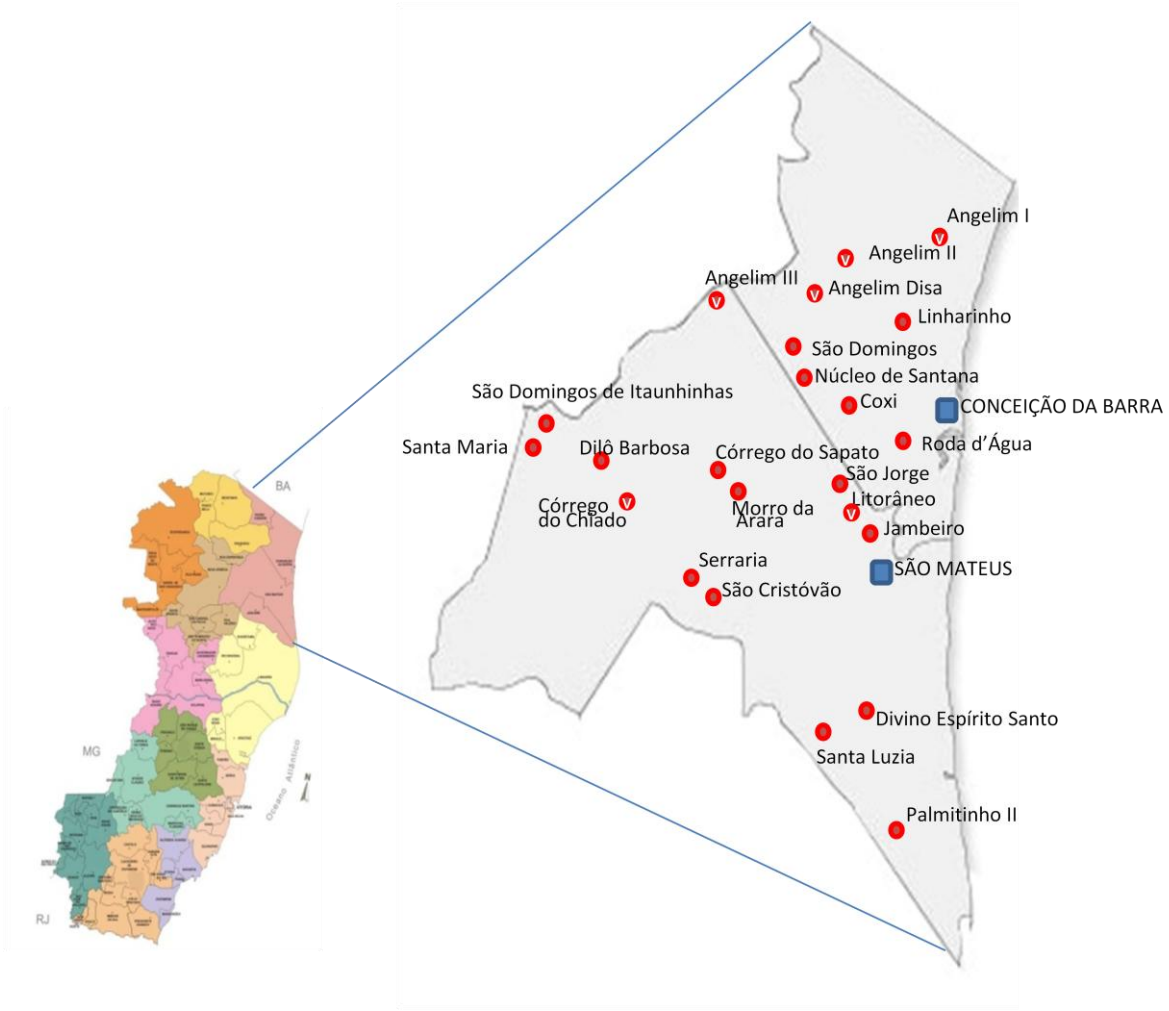

Figura 6. Mapa dos municípios de São Mateus e Conceição da Barra e as respectivas Comunidades Quilombolas.

Estas comunidades, constituída de aproximadamente 1.200 famílias, são semi-isoladas e estão localizadas em zonas rurais cercadas de canaviais e eucaliptais. Encontram-se relativamente distantes dos centros urbanos de seus municípios, sendo a comunidade mais próxima localizada a 20 Km do centro do município de

São Mateus (Programa Egbé- Territórios Negros, 2005). Vivem de uma agricultura rudimentar e do aproveitamento de madeira de eucalipto que são utilizados na produção de carvão vegetal. As mulheres desempenham atividade comercial em feiras livres, nas quais são vendidas comidas típicas como tapioca, beiju e outros alimentos fabricados a partir da mandioca (Programa Egbé- Territórios Negros, 2005).

Menos de 5% da população residente nas Comunidades Quilombolas é provida com rede de esgoto e coleta de lixo; 55-80% destas possuem fossa séptica e a grande maioria das comunidades utiliza água de chuva armazenada em cisternas para consumo, higiene pessoal e para preparo de alimentos. A maioria das casas das comunidades é construída de pau-a-pique e o assoalho é constituído de barro batido (Figura 7).

Figura 7. Casa quilombola de construção típica de pau-a-pique, no momento da visita de Agente Comunitário de Saúde.

4.2 TIPO DE ESTUDO E DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Trata-se de um estudo caso-controle com amostras fecais obtidas de crianças Quilombolas com e sem diarréia, respectivamente, residentes em Comunidades Quilombolas da Região Sapê do Norte, abrangendo os Municípios de São Mateus e de Conceição da Barra, do Norte do Espírito Santo, coletadas no período entre agosto de 2007 a dezembro de 2009.

Foram inseridas neste estudo amostras fecais provenientes de crianças de até 12 anos de idade, com (n=106) e sem (n=319) diarréia, preservadas em meio de transporte ou “in natura”, respeitando os prazos requeridos para manutenção da viabilidade bacteriana, para isolamento dos patógenos (Item 4.5). Foram utilizados para caracterizar episódios diarréicos a consistência reduzida das fezes e/ou aumento no número de evacuações, com três ou mais evacuações no intervalo de 24 horas. Como amostras controle, foram incluídas aquelas provenientes de crianças sem episódio diarréico relatado, das mesmas comunidades, faixa etária e sexo. Foram excluídas das análises bacteriológicas, amostras coletadas por tempo superior a 24 horas e mantidas à temperatura ambiente por mais de duas horas e/ou sem meio de transporte.

4.3 ARTICULAÇÃO PARA COLETA DOS ESPÉCIMES

Para a realização das coletas de dados e fezes, as comunidades foram visitadas e os membros sensibilizados. Através de contato com as Secretarias Municipais de Saúde de Conceição da Barra e de São Mateus, ES, foram obtidos os contatos com as principais referências técnicas e comunitárias, como os Coordenadores de Equipes de Saúde da Família (ESF), Enfermeiros Chefes das Unidades Básicas de Saúde (UBS), Técnicos e principalmente as lideranças comunitárias ligadas aos movimentos quilombola e negro.

Através de ligação telefônica foi estabelecido contato com membros de cada uma das comunidades participantes. No primeiro contato foram propostas visitas às comunidades para conhecimento da região e contato pessoal com as lideranças.

Após esse primeiro contato, foram agendadas reuniões em cada uma das comunidades, onde foram convidados pais e responsáveis pelas crianças de até cinco anos de idade. Nas reuniões, os objetivos deste projeto e do grupo de trabalho foram apresentados de forma didática, transparente e integral. Aos membros da comunidade e aos técnicos foi sempre feita a pergunta se eles desejariam participar do projeto. Diante da aceitação por parte dos membros das comunidades e dos técnicos, estabelecia-se cronograma de visitas às comunidades para coleta de fezes.

As mães e responsáveis pelas crianças receberam informações sobre como se caracteriza um quadro de diarréia aguda, assim como sobre a necessidade de comunicação ao seu Agente Comunitário de Saúde (ACS) e sobre a coleta de amostra fecal, identificação e acondicionamento.

Os técnicos das UBS foram preparados para atender as mães ou responsáveis por crianças com diarréia e para a coleta de fezes em coletores universais, identificação das crianças e das amostras, acondicionamento e envio para o Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Norte do Espírito Santo, centro pertencente à UFES no município de São Mateus.

A estratégia inicial foi a de solicitar às mães e responsáveis a identificação, coleta e encaminhamento de todos os casos de diarréia entre crianças de até cinco anos de idade.

Diante da sensibilização feita, foram feitos contatos telefônicos diários com as UBS e posteriormente aguardavam-se os contatos das mesmas, e contatos periódicos foram sempre estabelecidos para nova sensibilização.

Uma segunda estratégia de coleta foi implantada ao longo dos trabalhos: foram ofertados gratuitamente às crianças, exames parasitológicos de fezes e dessa forma, passou-se a solicitar uma coleta mensal de fezes para todas as crianças abaixo dos cinco anos residentes na comunidade, incluindo crianças com e sem diarréia naquele momento da visita. Através dessa estratégia, seriam identificados os casos de diarréia em cada momento. Em função de demanda espontânea a idade das crianças foi alterada para até 12 anos.

Os resultados dos exames parasitológicos eram divulgados para os responsáveis através de seus ACS. Crianças com resultados positivos foram encaminhadas à UBS mais próxima para consulta médica.

Assim, houve paralelamente diferentes estratégias para detecção da diarréia aguda comunitária.

4.4 ASPÉCTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto está inserido em um estudo sobre agentes infecciosos bacterianos e virais em fezes de crianças quilombolas e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo em 20 de dezembro de 2006 (Anexo 1). Todas as informações obtidas como nome, idade, comunidade e demais dados sócio-demográficos (Anexo 2 e 3), somente foram utilizadas para a proposta da pesquisa e a confidencialidade foi protegida durante todo o tempo. Todos os instrumentos da pesquisa estão armazenados em um arquivo específico e mantidos sob a responsabilidade da proponente na sala pessoal do Laboratório de Gastroenterite Infecciosa (LabGIn), Departamento de Patologia da UFES. Nomes e identificação individual não serão utilizados nas publicações resultantes do estudo.

Este projeto inicialmente analisava fezes de crianças até cinco anos de idade, porém, como beneficência à população quilombola, também foi realizado exame parasitológico de todas as crianças das famílias, sendo assim, estas amostras também foram incluídas neste estudo. Diante disso, foi enviada uma emenda ao Comitê de Ética em Pesquisa do CCS-UFES, solicitando o estudo de amostras fecais de crianças de até 12 anos, sendo esta aprovada em reunião do dia 24/06/09.

4.5 COLETA E TRANSPORTE DO MATERIAL CLÍNICO E ISOLAMENTO BACTERIANO

Amostras fecais obtidas nas Comunidades Quilombolas foram transportadas, parte delas em meio de transporte bacteriano Cary-Blair (Anexo 4.1), mantidas por até 24

horas da coleta, ao Laboratório de Procedimentos Microbiológicos (LPM) do CEUNES, em São Mateus por pesquisador colaborador. O restante das fezes foi acondicionado *in natura*, preservado em *freezer* -20ºC e serve à pesquisa de agentes infecciosos virais. Nos casos de recém-emissão das fezes, estas foram encaminhadas *in natura*, desde que respeitado um tempo máximo de duas horas até semeadura nos meios de cultura em laboratório.

No LPM-CEUNES, as fezes foram semeadas em meios de cultura diferenciais de baixa e de média seletividade, ágar MacConkey e ágar Hektoen (Anexo 4.1), para isolamento de *E. coli* e de *Salmonella* spp e *Shigella* spp, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C por 18-24 h. Após este tempo, foram mantidas a 8ºC e então enviadas ao LabGIn (Laboratório de Gatroenterites Infecciosas), Departamento de Patologia da UFES, acondicionadas em caixas térmicas, obedecendo às condições de biossegurança, através de transporte semanal em condução do próprio CEUNES-UFES.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli*

Colônias sugestivas de *E. coli*, até cinco fermentadoras da lactose (Lac+) e até duas colônias não fermentadoras da lactose (Lac-), sem ou com H_2S, sugestivas de *Shigella* e de *Salmonella*, respectivamente, foram submetidas a testes fenotípicos de determinação do metabolismo bacteriano para identificação do gênero/espécie, constituído por caldo peptonado, caldo Vermelho de Metila, MILi (Motilidade, Indol, Lisina descarboxilase), citrato, fenilalanina e TSI (tríplice açúcar com ferro) (Anexo 4.1), conforme descrito a seguir.

4.6.1 Caldo Vermelho de Metila-Voges Proskauer

Caldo Vermelho de Metila-Voges Proskauer (VMVP) foi utilizado para analisar via de fermentação da glicose, basendo-se no fato das enterobactérias fermentarem a glicose pelas vias: (i) ácida mista, que resultam em um pH do meio inferior a 4,4, sendo o limite de viragem do indicador vermelho de metila, ou; (ii) butileno-glicólica

ou acetoína, em que além de ácidos mistos, é produzida a acetoína, conferindo pH superior a 4,4. Após 48 horas de incubação com a bactéria o indicador Vermelho de Metila foi adicionado. Reação positiva é observada em 90% ou mais das amostras de *E. coli*, de *Shigella* e de *Salmonella*, (Koneman et. al, 2001). A reação de Voges-Proskauer não foi realizada neste estudo.

4.6.2 Motilidade, Indol, e Lisina descarboxilase (MILi)

O meio semi-sólido MILi foi utilizado para analizar motilidade bacteriana, produção de indol e descarboxilação da lisina, após 24 horas de incubação.

Motilidade bacteriana é caracterizada pela disseminação de bactérias além da linha de inoculação no meio semi-sólido e conseqüente turvação, caso a bactéria seja móvel (Trabulsi et al., 2005; Koneman et. al, 2006). Cerca de 95% das cepas de *E. coli* são móveis, enquanto *Shigella* e EIEC são imóveis e *Salmonella*, móvel (Murray et al., 2007).

A lisina descarboxilase atua sobre a porção carboxila do aminoácido lisina, com a formação de aminas, que alcalinizam o meio (coloração acinzentada a roxa). Cepas de *E. coli* podem ou não possuir a enzima em 90% e 10% dos casos, respectivamente. Cepas características de *Shigella* são lisina descarboxilase negativas, enquanto as cepas de *Salmonella*, são positivas em 95% (Trabulsi et al., 2005; Koneman et. al, 2006; Murray et al.,2007).

As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de degradar o triptofano, com produção do gás volátil indol, que é detectado através da adição de um reativo contendo p-dimetilaminobenzaldeído (reativo de Kovacs) adicionado ao meio após incubação. Na presença de indol, forma-se um complexo com coloração vermelha na superfície. Esta reação é positiva para 98% das amostras de *E. coli*, 23% para *Shigella boydii, 40% Shigella dysenteriae,* 42% para *Shigella flexneri* e é negativa para cepas de *Shigella sonnei* e de *Salmonella* (Murray et al., 2007).

4.6.3 Tríplice açúcar com ferro (ágar TSI)

O meio TSI contém glicose, lactose e sacarose em concentrações diferenciadas (1:10:10) para permitir observar a fermentação da glicose e da lactose e/ou sacarose além da geração de gás CO_2 pela fermentação da glicose. A presença de sais de ferro propicia detectar H_2S que ocorre pelo metabolismo de $Na_2S_2O_3$ e de aminoácidos sulfurados, presente em bactérias como *Salmonella*. A maioria das cepas de *E. coli* caracteriza-se como fermentadora de lactose e de sacarose e como produtoras de gás de glicose. Tanto cepas de *Shigella* quanto de *Salmonella* são Lac-, porém *Salmonella* produz gás a partir da glicose (Koneman et. al, 2006).

4.6.4 Citrato de Simmons

Consiste na capacidade da bactéria que possui a enzima citratase utilizar citrato de sódio como única fonte de carbono para seu metabolismo, levando-a a consumir fonte inorgânica de P, N e S produzindo compostos alcalinos e consequente viragem do indicador azul de bromotimol para azul, que em pH neutro se mantém verde. A enzima é encontrada no gênero *Salmonella* e ausente em *E. coli* e em *Shigella*. (Trabulsi et al., 2005; Koneman et. al, 2006).

4.6.5 Ágar Fenilalanina

Este teste foi realizado somente quando as amostras eram Lac- (para diferenciar *Salmonella* de *Proteus*). Baseia-se no fato da enzima fenilalanina desaminase realizar desaminação oxidativa da fenilalanina gerando ácido fenilpirúvido, evidenciado pela formação de um complexo após a adição de $FeCl_3$, encontrada em espécies da tribo *Proteae* e em algumas espécies de *Enterobacter* (Trabulsi et al., 2005; Koneman et. al, 2006).

4.7 ESTOCAGEM DAS CEPAS DE *E. coli*

Cepas identificadas como *E. coli* foram mantidas em ágar nutriente em geladeira e em sacarose a 24%, como criopreservante, em *freezer* -20ºC para posterior realização dos testes de aderência em cultura de células Hep-2 (item 3.6) e pesquisa de genes de virulência (item 8).

4.8 SOROLOGIA

Cepas bioquimicamente sugestivas de *Shigella* e de EIEC (*E. coli* Lac-) foram submetidas à reação sorológica inicialmente com antissoros específicos para cada espécie de *Shigella* (*S. flexneri, S. boydii, S. sonnei, S. dysenteriae*) e, se negativo, com antissoro polivalente para os sorogrupos de EIEC (Probac do Brasil) após fervura da suspensão bacteriana por 1 hora, segundo instruções do fabricante. Suspensão de cepas sugestivas de *Salmonella* foi submetida à aglutinação com antissoro polivalente somático (Probac do Brasil), segundo instruções do fabricante. As reações de aglutinação em lâmina foram realizadas conforme brevemente descrita a seguir: a cada 50 µL de suspensão bacteriana em solução salina foram adicionados 50 µL do antissoro correspondente e homogeneizados durante um a dois minutos para observação da aglutinação.

4.9 TESTE DE ADESÃO A CÉLULAS HEp-2

Todas as cepas isoladas de *E. coli* foram submetidas ao teste de aderência em células HEp-2 em presença de D-manose de acordo com metodologia descrita previamente (Scaletsky et al., 1984). Dessa forma, 10^5 células HEp-2 foram cultivadas em meio *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) (Cultilab™) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab™) em placas de poliestireno (Falcon ™) de 24 poços à 37°C em presença de 5% de CO_2 até semiconfluência. Paralelamente, crescimento bacteriano foi realizado em 3 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Merck™) por 16 a 18 horas a 37ºC e então, $3x10^7$ UFC (aproximadamente 20 µL) do caldo de crescimento bacteriano foram inoculados à camada de células HEp-2 com 1 mL de DMEM contendo 2% de SFB e 1% de D-

manose (Amresco™), seguido por incubação a 37ºC por três horas. As placas foram lavadas com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) por três vezes, fixadas com metanol, coradas com Fucsina básica diluída (Fucsina de Gram) e examinada ao microscópio de luz em objetiva de 10X e 40X.

4.10 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO

Cepas de *E. coli* foram repicadas a partir do estoque em ágar MacConkey, incubadas a 37ºC por 16 a 24 hs e uma a duas colônias de cada cepa/espécime foram suspensas em 50 µL de água deionizada em microtubo de 500 µL e fervida por cinco minutos. Os microtubos foram centrifugados a 10.000xg por um minuto, 40 µL do sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C.

4.11 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Os patotipos de DEC (tEPEC, aEPEC, EIEC, ETEC, EHEC e EAEC) foram evidenciados usando uma cepa/espécime ou triados a partir de *pool* de cepas (2-6), conforme a quantidade de cepas de *E. coli* isoladas por espécime. PCR monoplex ou multiplex, foram realizados com 2 µL de DNA, extraídos de cada cepa/espécime (Item 4.10), com protocolos distintos, descritos como Ensaios 1 e 2 (definidos pelo programa de amplificação), para a pesquisa de genes de virulência. No Ensaio 1 foram pesquisados os seguintes genes: (i) *eae* (tEPEC e aEPEC, EHEC), (ii) *bfpA* (tEPEC) e, (iii) CVD432 (EAEC). No Ensaio 2, foram pesquisados: (i) *lt* e *st* (ETEC), (ii) *stx1* e *stx2* (EHEC), (iii) *ipaH* (EIEC ou *Shigella*) (Figura 8). PCR monoplex foi realizada para pesquisa dos genes *bfpA* e *ipaH;* PCR multiplex, para pesquisa de *eae* e CVD432; e para pesquisa de *lt*, *st*, *stx1* e *stx2* (Figura 8). Os iniciadores utilizados e os programas de amplificação dos Ensaios 1 e 2 foram previamente descritos por Aranda et al. (2004) (Quadros 2 e 3).

No caso de *pool* com resultado positivo para quaisquer das DEC, foram realizadas nova PCR com as cepas individualmente, para identificar aquela(s) positiva(s).

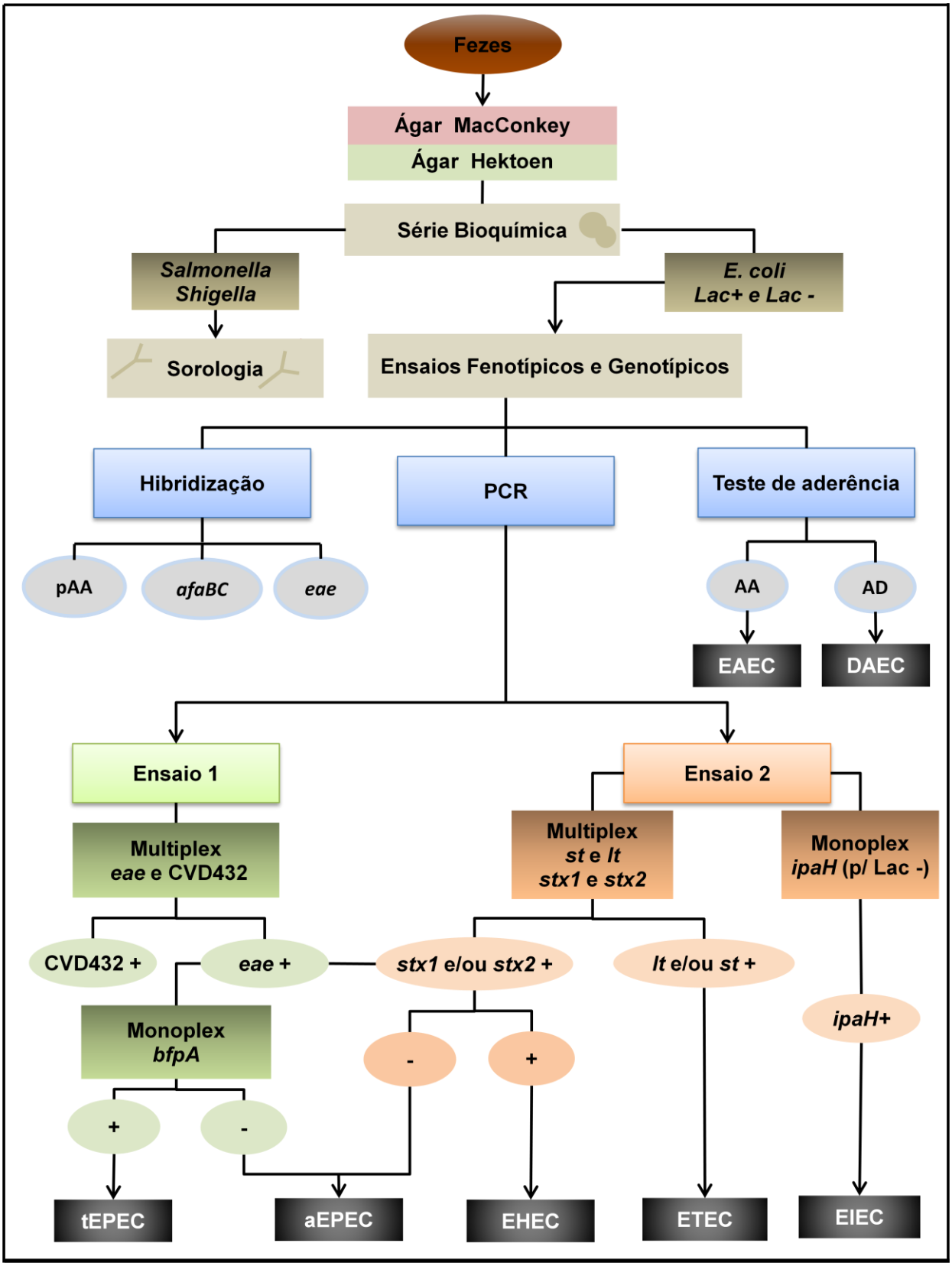

Figura 8. Fluxograma do processamento e identificação dos patotipos de DEC por PCR, aderência em cultura de células e hibridização de colônia.

Quadro 2. Sequência de iniciadores usados nos Ensaios 1 e 2 com respectivos genes e tamanhos de fragmentos obtidos*.

Ensaio	Iniciadores	Seqüência de bases (5' → 3')	Gene/sonda alvo	Tamanho fragmento (pb)
1	eae1 eae2	CTGAACGGCGATTACGCGAA CCAGACGATACGATCCAG	*eae*	917
	bfpA1 bfpA2	AATGCTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	*bfpA*	326
	EAEC1 EAEC2	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	CVD432	630
2	LTf LTr	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATTCCCTGTT	*lt*	450
	STf STr	ATTTTTMTTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	*st*	190
	IpaH1 IpaH2	GTTCCTTGACCGCTTTCCGATACC GTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGT AG	*ipaH*	600
	Stx1f Stx1r	ATAAATCECCATTCGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	*stx1*	180
	Stx2f Stx2r	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	*stx2*	255

*Aranda et al. (2004)

A mistura da reação foi estabelecida neste estudo e consistiu de um volume final de 25 µL (para cepa individual ou pool de 2-3 cepas) ou de 50 µL (pool de 4-5 cepas) contendo 2 µL de DNA/cepa, 200 µM de cada dNPT (Invitrogen^{TM}), tampão de reação (Tris-HCl 10mM, pH 8,3, KCl 50 mM), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,2 uds (unidades) de enzima Taq polimerase *Platinum*^{TM} (Invitrogen).

Quadro 3. Programas de amplificação usados nas PCR monoplex e multiplex referentes aos Ensaios 1 e 2.

Fase do programa	Programa de amplificação†					
	Ensaio 1*			Ensaio 2**		
	Tempo	°C	Ciclos	Tempo	°C	Ciclos
Início	2min	50	1	2min	50	1
Desnaturação inicial	5min	95	1	5min	95	1
Desnaturação	40s	95	40	45s	95	40
Hibridização	1min	58	40	1min	50	40
Extensão	2min	72	40	1min	72	40
Extensão final	7min	72	1	7min	72	1

eae, bfpA e* CVD432; ***lt, st, stx1, stx e, ipaH;* **† Aranda et al. (2004)

Dez microlitros de produto de cada PCR com 1,5 µL de solução de arrasto (Anexo 5) foram submetidos à eletroforese (100 volts) em gel de agarose a 2% em tampão Tris-borato-EDTA (Anexo 4.3). O gel foi corado com solução de brometo de etídeo (EtBr) 0,5 µg/mL, os fragmentos observados em Sistema de fotodocumentação em gel Mini BisPro™ (BioAmérica) e comparados com padrão de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen).

4. 12 TESTE DE HIBRIDIZAÇÃO DE COLÔNIA

A detecção de genes de virulência através de hibridização com sondas radioativas foi realizada no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), da professora Drª Isabel Cristina Affonso Scaletsky.

Todas as cepas de *E. coli* foram submetidas à hibridização de colônia com sonda radioativa marcada com ^{32}P, para os seguintes genes alvos: (i) *eae* (EPEC e EHEC), (ii) *afaBC* (DAEC) e (iii) pAA (EAEC). As cepas estocadas foram repicadas em 3 mL de caldo triptose de soja (*Tryptic Soy Broth* – TSB), incubadas por 16 horas a 37ºC e

então, repicadas em ágar MacConkey (50 cepas/placa) como *colony blot*, e incubadas por 16 horas a 37ºC. Papel de filtro Whatman nº 541 foi colocado sobre os *colony blots* para transferi-los, durante 10 min (Figura 8A, B). O papel foi então removido cuidadosa e devidamente identificado, e em seguida tratado com soluções de lise e desnaturação com a finalidade de obter o DNA bacteriano desnaturado. As soluções e a sequência em que foram utilizadas foi (i) SDS (Duodecil Sulfato de Sódio) por três minutos; (ii) NaOH (0,5M)/NaCl (1,5M) por cinco minutos; (iii) NaCl Tris por cinco minutos; (iv) Solução de citrato de sódio salino (SSC) por cinco minutos (Figura 8C). Em seguida, os papéis foram secos a 37ºC e fixados a uma folha de papel espesso recobertos com papel transparente de cloreto de polivinila (PCV) para posterior hibridização (Figura 8D).

As sondas foram obtidas por amplificação através da técnica de PCR a partir do DNA total das amostras protótipos. Os fragmentos foram marcados com [α-^{32}P]dCTP, utilizando para isso um *kit* comercial de marcação Ready-To-Go™ (Amersham Pharmacia Biotech), posteriormente, a remoção dos nucleotídeos não incorporados foi realizada através de microcoluna de sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech).

A hibridização foi conduzida sob condições específicas proporcionadas por um tampão de hibridização com a seguinte composição: 5X SSC (Anexo 4.4), 0,5% SDS, 10 mM EDTA, 1X de solução de Denhardt (Anexo 4.4), e 100 µg de DNA de esperma de salmão/mL. Os *colony blots* foram hibridizados à temperatura de 65ºC “overnight”, lavados com tampão de lavagem composto por 0,1X SSC e 0,1% SDS a 65ºC, e por último, os filtros foram expostos ao filme de raio-X “overnight” a -80ºC para sensibilização e posterior revelação do filme de raio X.

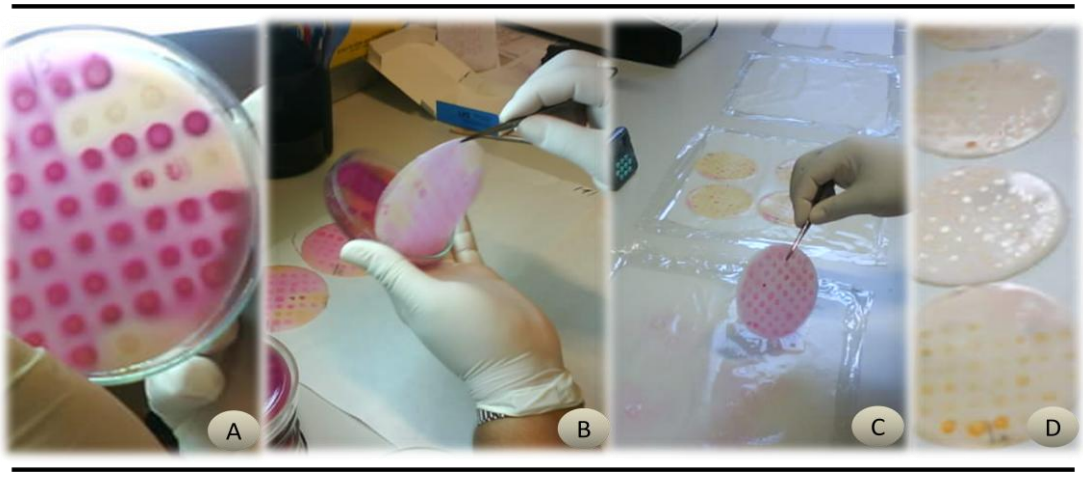

Figura 9. Teste de hibridização de colônia. A. Papel de filtro colocado sobre os *colony blot*; B. a retirada do papel de filtro; C. o tratamento dos filtros; D. secagem dos filtros sobre o papel mais espesso

4. 13 CEPAS CONTROLES

As cepas controle utilizadas para os ensaios de aderência, PCR e a HC empregados na detecção dos patotipos estão dispostos no Quadro 4.

Quadro 4. Cepas padrão utilizadas nos ensaios de detecção dos patotipos de DEC.

Patotipo	Cepas Padrão
EAEC	042
EPEC	E2342/69
ETEC	H10407
DAEC	C1845
EHEC	EDL933
EIEC	EDL1284
E. coli (Controle negativo)	HB101

4. 14 CRITÉRIOS DE DETERMINAÇÃO DOS PATOTIPOS DE DEC

As cepas/espécimes isoladas de *E. coli* foram classificadas em cada patotipo usando os seguintes critérios: (i) tEPEC, se positivo para *eae* e *bfpA*; (ii) aEPEC, se positivo para *eae,* negativo para *bfpA*; (iii) ETEC, se positivo para *lt* e/ou *st*; (iv) EIEC, se positivo para *ipaH*; (v) EHEC, se positivo para *eae* e para *stx1* e/ou *stx2*; (vi) EAEC, se positivo para padrão AA com ou sem pAA, positivo ou negativo para CVD432; (vii) DAEC, se positivo para padrão AD com ou sem *afaBC* (Nataro & Kaper, 1998).

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados das pacientes foram armazenados de forma anônima num banco de dados criado no programa SPSS – *data entry* (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17 e submetidos às análises de frequência para as variáveis categóricas. Dados foram analisados com teste qui-quadrado para variáveis categóricas no *Data Analysis and Statistical Software* STATA, versão 9.0, com valor de significância estatística < 0,05.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS ANALISADAS E DADOS DEMOGRÁFICOS

As amostras fecais coletadas e analisadas perfizeram um total de 425 e foram oriundas de 25% de crianças com (n=106) e de 75%, sem (n=319) diarréia, de 25 Comunidades Quilombolas do norte do Estado do Espírito Santo, 17 delas localizadas no município de São Mateus e oito, de Conceição da Barra (Quadro 5).

Quadro 5. Relação das Comunidades Quilombolas nos municípios de São Mateus e Conceição da Barra. Amostras fecais coletadas dos grupos controle e diarréia.

MUNICÍPIO	COMUNIDADES	Número de amostras		
		Diarréia	Controle	Total
São Mateus	Angelim III	2	19	21
	Córrego do Chiado	9	33	42
	Córrego do Sapato	2	2	4
	Dilô Barbosa	1	29	30
	Divino Espírito Santo	7	34	41
	Jambeiro	7	6	13
	Litorâneo	2	0	2
	Morro da Arara	4	9	13
	Nova vista II	0	3	3
	Palmitinho II	8	40	48
	Porto	12	8	20
	Santa Luzia	1	13	14
	São Cristovão	4	19	23

	São Domingos Itauninhas	3	7	10
	São Jorge	8	8	16
	Santa Maria	10	14	24
	Serraria	1	13	14
Conceição da Barra	Angelim I	8	10	18
	Angelim II	1	0	1
	Angelin Disa	1	4	5
	Coxi	0	6	6
	Linharinho	3	10	13
	Núcleo de Santana	2	0	0
	Roda d'água	1	11	12
	São Domingos	9	21	30
Total	25	106	319	425

A coleta das amostras fecais ocorreu de agosto de 2007 a dezembro de 2009, sendo obtidas 6,2% (26/425), 25,4% (108/425) e 68,4% (290/425) das amostras em cada ano, respectivamente (Figura 10).

A distribuição do total de amostras obtidas das crianças > zero a 12 anos quanto às diferentes faixas etárias e sexo em relação aos grupos diarréia e controle estão dispostos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Distribuição das amostras fecais obtidas por faixas etárias das crianças quilombolas referentes aos grupos diarréia e controle.

Faixa etária	Diarréia n (%)	Controle n (%)	Total n (%)
>0-12 meses	33 (31,1%)	66 (20,7%)	99 (23,3%)
>12-24 meses	17 (16%)	27 (8,5%)	44 (10,3%)
>2-3 anos	17 (16%)	37 (11,6%)	54 (12,7%)
>3-5 anos	20 (18,9%)	79 (24,8%)	99 (23,3%)
> 5 anos	19 (18%)	110 (34,5%)	129 (30,3%)
Total	106	319	425

Tabela 2. Distribuição das amostras fecais obtidas por sexo das crianças quilombolas referentes aos grupos diarréia e controle.

Sexo	Diarréia n (%)	Controle n (%)	Total n (%)
Masculino	68 (64,1%)	148 (46,4%)	216 (50,8%)
Feminino	38 (35,9%)	171 (53,6%)	209 (49,2%)
Total	106 (25%)	319 (75%)	425 (100%)

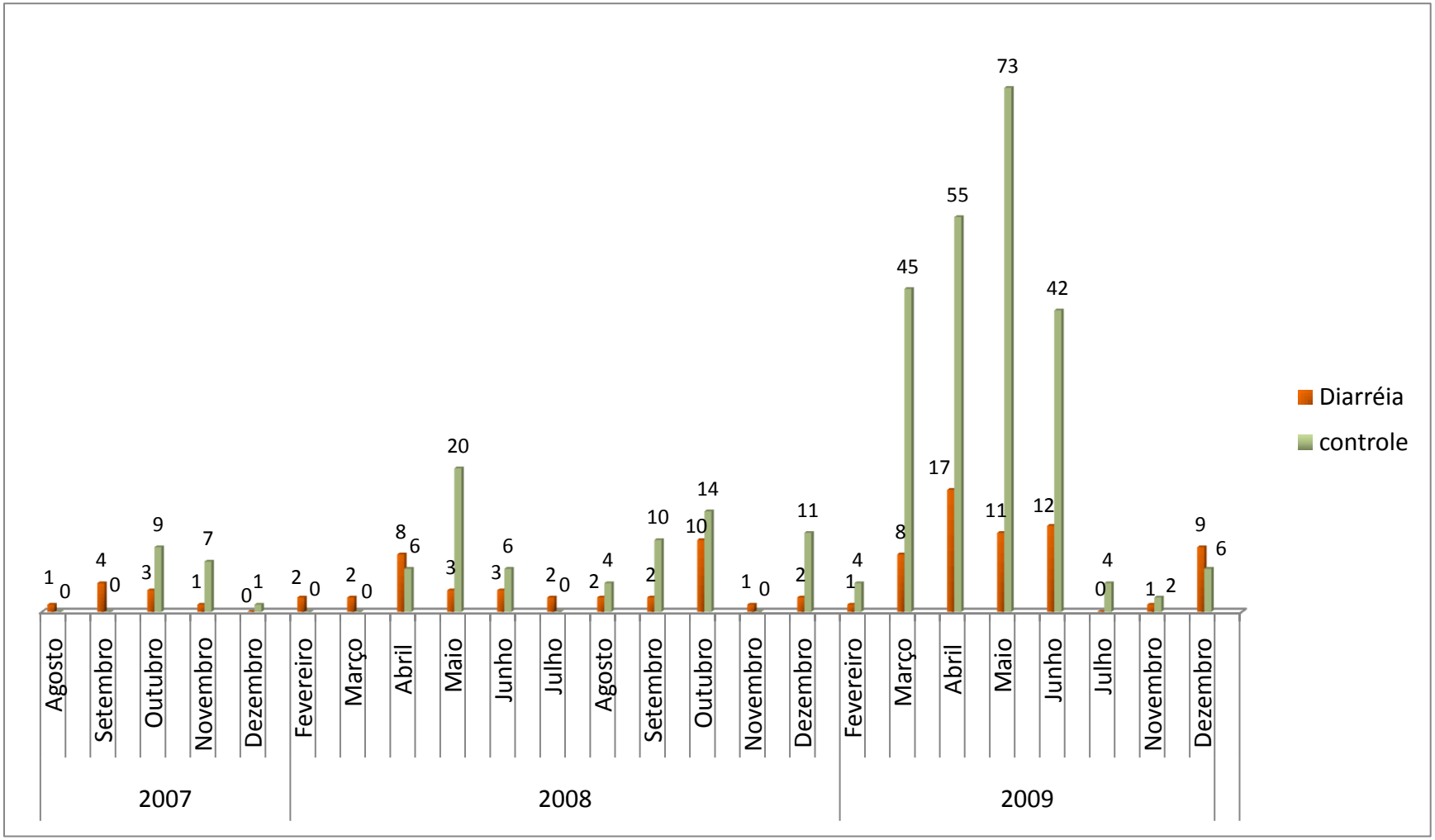

Figura 10. Gráfico demonstrando o número de amostras coletadas nos meses referentes ao período de coleta, compreendido entre o ano de 2007 a 2009.

5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli*, *Shigella* E *Salmonella*

As 425 amostras fecais obtidas de crianças quilombolas com (n=106) e sem (n=319) diarréia foram semeadas em meios de isolamento primário de baixa (MacConkey) e de média (Hektoen) seletividade, conforme previamente descrito, para o isolamento e identificação de *E. coli*, com posterior determinação dos patotipos diarreiogênicos por métodos fenotípicos e genotípicos e, de *Shigella* e *Salmonella*.

Das amostras analisadas, *Shigella* foi identificada por reações bioquímicas e por sorologia em 1,4% (6/425) dos casos, três no grupo controle e outros três no grupo diarréico. *Salmonella* não foi encontrada em nenhuma das amostras analisadas.

E. coli foi isolada em 90% (382/425) das amostras analisadas, correspondendo a 91,5% (97/106) e 89,3% (285/319) das amostras obtidas de crianças com e sem diarréia, respectivamente. O total de cepas de *E. coli* analisadas neste estudo foi de 1.475, sendo 90,5% (n=1.334) e 9,5% de cepas Lac+ e Lac-, respectivamente.

5.3 DETECCÃO DE *E. coli* DIARREIOGÊNICA (DEC)

Patotipos de DEC foram evidenciados por métodos fenotípicos (aderência em cultura de células) e/ou genotípicos (hibridização e PCR) conforme discriminado a seguir.

5.3.1 Padrão de adesão a células HEp-2

Os resultados referentes ao padrão de adesão apresentado pelas cepas de *E. coli* provenientes dos 382 casos estão apresentados na Tabela 3; Figura 11. O padrão de adesão mais freqüente foi o AA (44%; 168/382), seguido pelo AD (18%; 69/382), CLA (5%; 19/382) e AL (0,26%; 1/382).

Amostras de *E. coli* com o padrão AD foram associadas significantemente com diarréia (25 de 97 [25,8%] versus 44 de 285 [15,4%] dos controles; p = 0,022, χ^2= 5,2). As amostras de *E. coli* com o padrão de adesão AA foram encontradas com freqüência semelhante nas crianças com diarréia (49,5%) e sem diarréia (42,1%). O padrão de adesão CLA ocorreu em 3,1% (3/97) nas cepas isoladas do grupo diarréico e 5,6% (16/285) do grupo controle. Amostras com o padrão AL foram

encontradas em apenas 1% (1/97) das crianças com diarréia e não foram identificadas em crianças sem diarréia.

Tabela 3. Distribuição dos padrões de aderência AL, AA, AD e CLA em relação aos grupos diarréia e controle

Padrão de Aderência	Amostras Positivas		p*
	Diarréia	Controle	
AL	1% (1/97)	-	-
AA	49,5% (48/97)	42,1% (120/285)	>0,05
AD	25,8% (25/97)	15,4% (44/285)	<0,05
CLA	3,1% (3/97)	5,6% (16/285)	>0,05

AL: Aderência Localizada. AA: Aderência agrência agregativa. AD: Aderência difusa. CLA: Adência em cadeia. p* valor de p.

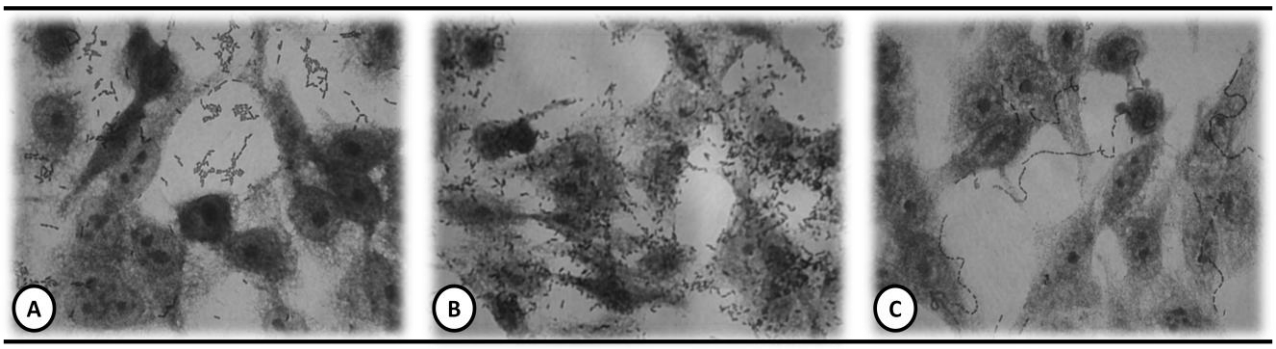

Figura 11. Padrão de aderência de cepas *E. coli* diarreiogênicas em cultura de células HEp-2. Microscopia de luz da aderência de cepas E. coli a células HEp-2 apresentando. A) aderência agregativa (AA), B) aderência difusa (AD) e C) aderência em cadeia (CLA).

5.3.2 Pesquisa de genes de virulência

5.3.2.1 PCR multiplex e monoplex

Genes de virulência foram pesquisados nas 1.475 cepas de *E. coli* isoladas, através de dois ensaios de PCR (descritos no item 4.11), em reações multiplex e/ou monoplex, para determinação da presença dos genes *eae, bfpA,* CVD432*, lt, st, ipaH,* stx_1 e stx_2. Cepas Lac+ e Lac- foram inicialmente submetidas ao Ensaio 1 para pesquisa dos genes *eae* e CVD432 (Figura 12); as cepas positivas para o gene *eae* foram submetidas à pesquisa de *bfpA* por PCR monoplex (Ensaio 1).

Das amostras analisadas, 20,9% (80/382) foram positivas para CVD432 e 9,7% (37/382) foram positivas para *eae* (Figura 12, Tabela 4). O gene *bfpA* foi pesquisado nas cepas positivas para o gene *eae* em nova reação de PCR monoplex e foi encontrado em três casos (0,8%) como mostra a Tabela 4.

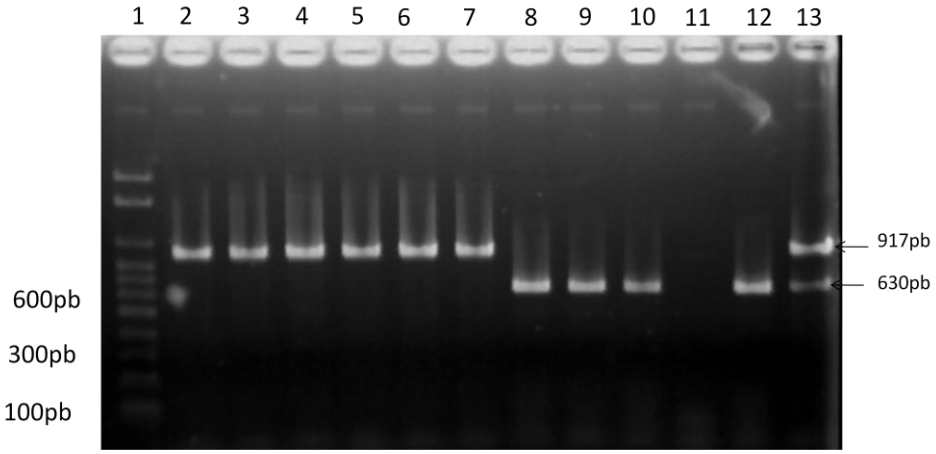

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose de produto de amplificação obtido em Ensaio 1 de PCR multiplex com inicadores para genes *eae* e CVD432. Coluna 1: padrão de peso molecular 100 pb; Coluna 2-7: amostras postivas para gene *eae* (917 pb); Colunas 8-10,12: amostras positivas para pCVD432 (630 pb); Coluna 11: amostra negativa; Coluna 13: controle positivo constituído pelas cepas EPEC E2342/69 e EAEC 042

O Ensaio 2 para pesquisa dos genes *lt, st, stx1* e *stx2* (Figura 13, Tabela 4) evidenciou 14 cepas positivas para *lt*, originárias de nove casos (2,1%), e destes, duas cepas referentes a dois casos distintos também foram positivos para *st*, consistindo todas estas o patotipo ETEC. Nenhuma das amostras foi positiva para *stx1* ou *stx2*, configurando ausência de EHEC dentre as amostras analisadas.

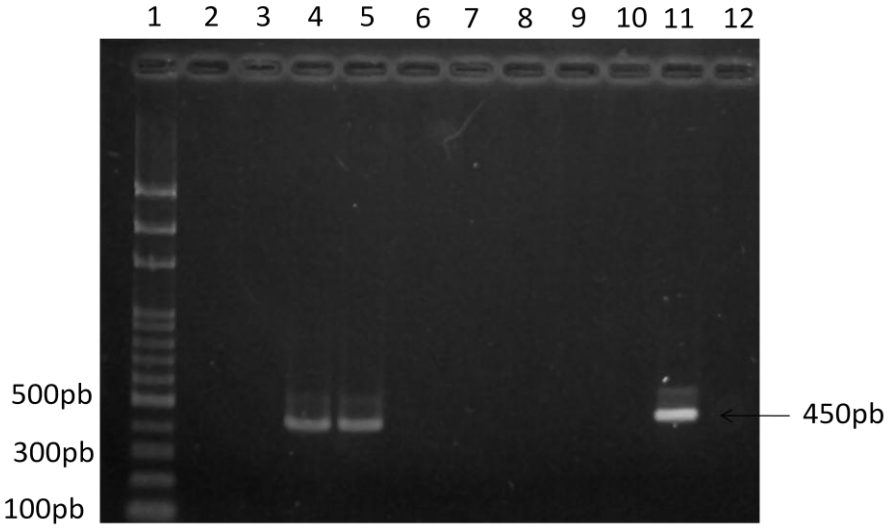

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose de produto de amplificação do Ensaio 2, utilizando iniciadores para genes *lt* e *st*. Coluna 1: padrão de peso molecular 100 pb; Colunas 2, 3 e 6-10: amostras negativas; Colunas 4 e 5: amostras positivas para ETEC (*lt*+), fragmento de 450 pb; Coluna 11: controle positivo (ETEC *lt*+); Coluna 12: controle negativo.

Todas as cepas Lac- foram submetidas ao Ensaio 2 para pesquisa do gene *ipaH* (Figura 14), sendo dois casos positivos para o gene, configurando o patotipo EIEC, isolado de duas crianças, sendo um em criança com diarréia e um, em sem diarréia.

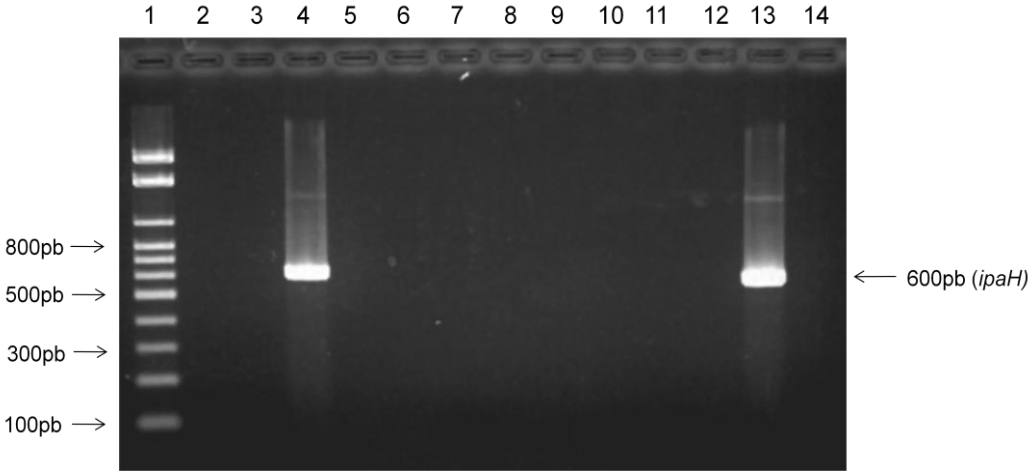

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose de produto de amplificação do Ensaio 2, utilizando iniciadores para o gene *ipaH*. Coluna 1: padrão de peso molecular 100 pb; Colunas 2, 3 e 5-12: amostras negativas; Coluna 4: amostra positiva para EIEC (*ipaH*+), fragmento de 600 pb; Coluna 13: controle positivo (EIEC *ipaH*+); Coluna 14: controle negativo.

Tabela 4. Distribuição dos genes pesquisados por PCR nas cepas de *E. coli* isoladas de crianças dos grupos diarréia e controle.

Genes	Amostras Positivas % (n/total)		
	Diarréia	**Controle**	**Total**
CVD432	23,7% (23/97)	20% (57/285)	20,9% (80/382)
eae	9,2% (9/97)	9,8% (28/285)	9,7% (37/382)
bfpA	0,9% (1/97)	0,7% (2/285)	0,8% (3/382)
lt	6,2% (6/97)	1% (3/285)	2,3% (9/382)
st	2% (2/97)	NE*	0,5% (2/382)
ipaH	1% (1/97)	0,03% (1/285)	0,5% (2/382)
stx1	NE	NE	-
stx2	NE	NE	-

NE* Não Encontrado

5.3.2.2 Hibridização de colônias

Todas as cepas isoladas de *E. coli* foram testadas com as sondas genéticas *eae*, pAA e *afaBC*, conforme descrito previamente (item 4.12). Foi observada positividade para *eae* de 9,9% (38/382), pAA de 12% (46/382) e *afaBC* de 10,5% (39/382). Na Figura 15 observa-se o padrão da amostras positiva (*spot* preto) e negativa (*spot* incolor) referente ao teste de hibridização de colônias.

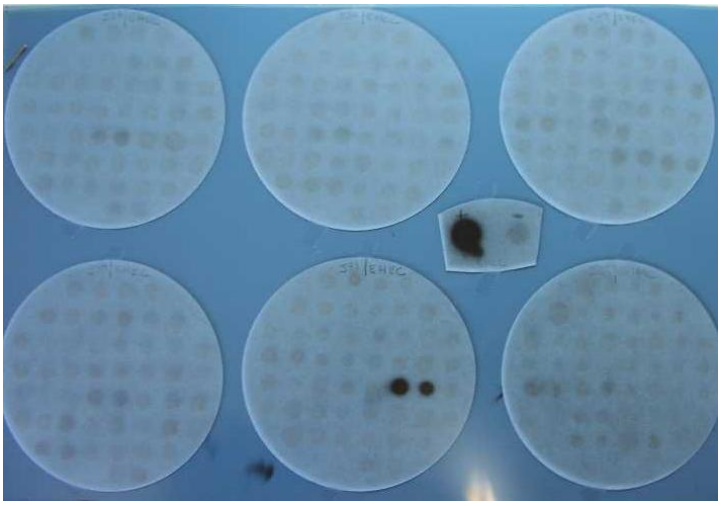

Figura 15. Filme de raio-X pelo qual são visualizados os resultados da hibridização de colônia. Em destaque, observa-se o padrão da amostra negativa e amostra positiva.

5.3.3 Deteccão e caracterizacão de EPEC, EAEC E DAEC

O critério para determinacão do patotipo EPEC utilizado no estudo foi *eae*+ e *stx*- sendo classificada em (i) tEPEC, se positivo para *eae* e *bfpA*; (ii) aEPEC, se positivo para *eae,* negativo para *bfpA*. Gene *eae* foi detectado em 51 casos, sendo 13 amostras por PCR, 14 por hibridização de colônia e 24, por ambas as metotologias.

Das amostras de *E. coli eae*+ *stx*- isoladas, 3 (5,7%) foram positivas com os iniciadores *bfpA*, sendo categorizadas como tEPEC e, destas, apenas uma amostra apresentou o padrão de adesão AL. Dois dos três casos de tEPEC encontrado foram observados em coinfecção com aEPEC. A Figura 16 mostra a relação entre os testes realizados de adesão em células HEp-2 (AL) e detecção de *eae* e *bfpA* nas

cepas isoladas de tEPEC. aEPEC foram caracterizadas em 50 (94,3%) amostras (*eae*+ *bfpA*-).

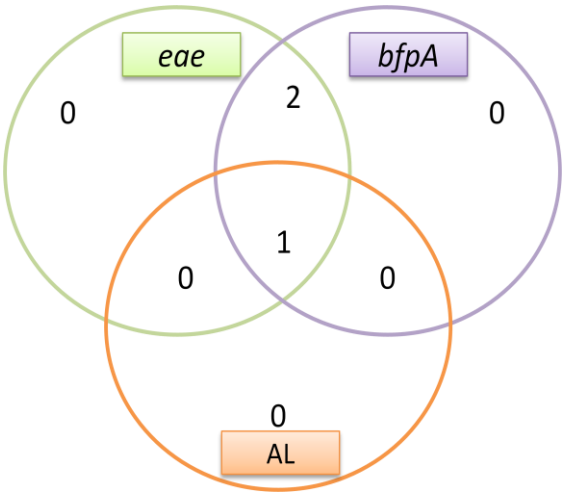

Figura 16. Diagrama de Venn demonstrando relação entre os testes realizados, aderência em cultura HEp-2 (AL) e detecção de *eae* e *bfpA* nas cepas isoladas de tEPEC.

O critério para categorização do patotipo EAEC utilizado no estudo foi o padrão de aderência AA, conforme previamente descrito (Nataro, 1998). Dos 168 casos de EAEC (AA+), observou-se que: 40,5% (68/168) destes foram detectados por PCR com os iniciadores CVD432 e 25,6% (43/168) por hibridização com a sonda genética pAA; 18,4% (31/168) foram positivos concomitantemente para pAA e CVD432 (Tabelas 5, 6 e Figura 17).

Tabela 5. Relação entre os casos positivos para o padrão de aderência AA e os casos em que foram detectados o gene CVD432 do total de casos de *E. coli* isoladas.

	AA*(%[n/total])		Total
CVD432	**Positivo**	**Negativo**	
Positivo	85% (68/80)	15% (12/80)	80
Negativo	33,1% (100/302)	66,9% (202/302)	302
Total	44% (168/382)	56% (214/382)	382

AA*: Padrão de aderência agregativa.

Tabela 6. Correlação de resultado obtido por iniciadores CVD432 e sonda genética pAA nas amostras com aderência agregativa.

AA*		**PCR (CVD432) (%[n/total])**		**TOTAL**
		Positivo	**Negativo**	
pAA	**Positivo**	72,1% (31/43)	27,9% (12/43)	25,6% (43/168)
	Negativo	29,6% (37/125)	70,4% (88/125)	74,4% (125/168)
TOTAL		40,5% (68/168)	59,5% (100/168)	168

AA*: Padrão de aderência agregativa.

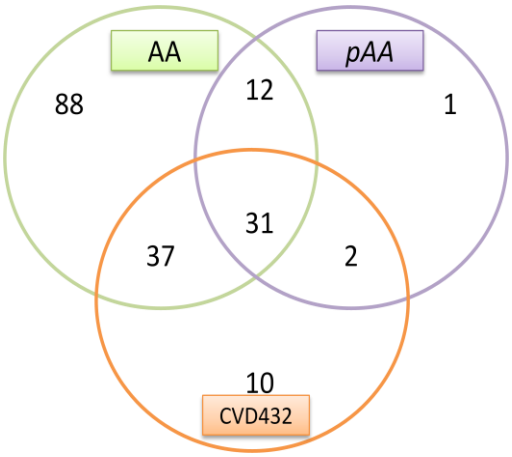

Figura 17. Diagrama de Venn demonstrando a relação entre os testes realizados, aderência agregativa em células HEp-2 (AA), detecção de CVD432 e pAA.

Patotipo DAEC, determinado pelo padrão de aderência difusa, foi isolado de 18,1% (69/382) dos casos, sendo que 49,3% (34/69) destes reagiram com a sonda *afaBC*. Este gene foi detectado em 10,1% (39/382), cinco destes não apresentaram o padrão AD (Tabela 7).

Tabela 7. Relação entre o padrão de adesão AD e a sonda genética *afaBC* na detecção de DAEC.

AD* **n (%)**	***afaBC*** **n (%)**	
	Positivo	**Negativo**
Positivo	49,3% (34/69)	50,7% (35/69)
Negativo	1,6% (5/313)	98,4% (308/313)
Total	10,1% (39/382)	89,9% (343/382)

AD*: Padrão de aderência difusa.

5.3.4 Frequência de patotipos de DEC entre as crianças quilombolas

Patotipos de DEC foram detectados por método fenotípico (aderência em células HEp-2) e/ou genotípicos (hibridização e PCR) em 56,9% (242/425) do total de amostras analisadas, o que corresponde a 63,3% (242/382) dos casos em que *E. coli* foi isolada (Tabela 8).

Baseado nos critérios de determinação de cada patotipo de DEC, descritos no item 4.13, a EAEC foi identificada em 43,9% (168/382) dos casos, DAEC em 18,1% (69/382), aEPEC 13,1% (50/382), ETEC 2,3% (9/382), tEPEC 0,8% (3/382), EIEC 0,5% (2/382) e EHEC em nenhuma das amostras (Tabela 5). A Figura 18 apresenta a prevalência de cada patotipo de DEC dentre os casos positivos para DEC (n=242).

Tabela 8. Patotipos de DEC detectados fenotipica e genotipicamente nos grupos diarréia e controle.

Patotipo	Grupo de crianças		Total n=382	p*
	Diarréia n=97	Controle n=285		
EAEC	49,5% (48)	42,1% (120)	44% (168)	>0,05
DAEC	25,8% (25)	15,4% (44)	18,1% (69)	<0,05
aEPEC	13,4% (13)	13%(37)	13,1% (50)	>0,05
tEPEC	1% (1)	0,7% (2)	0,8% (3)	-
ETEC	6,2% (6)	1% (3)	2,3% (9)	-
EIEC	1% (1)	0,3% (1)	0,5% (2)	-
DEC	68% (66)	61,7% (176)	63,3% (242)	>0,05

p* valor de p.

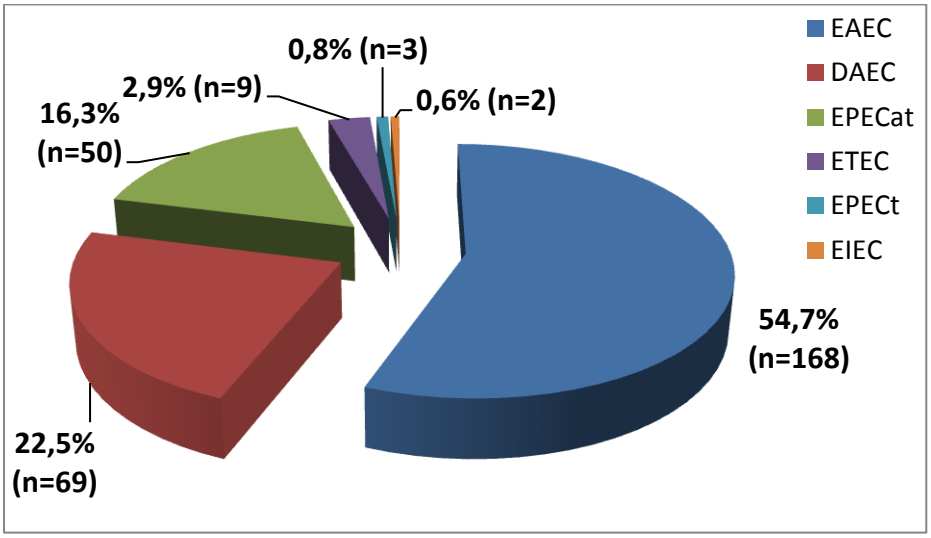

Figura 18. Gráfico evidenciando a freqüência dos patotipos de DEC dentre os casos em que foram detectados pelo menos um dos patotipos pesquisados (n=301).

5.3.5 Infecção mista

As infecções mistas, caracterizadas pela presença de mais de um patotipo de DEC, foram observadas em 12,5% (48/382) do total de casos estudados, sendo 21,6% (21/97) nas amostras diarréicas e 9,5% (27/285) no grupo controle, significativamente associadas à diarréia (p=0,0018; χ^2=9,77) (Tabela 9).

Tabela 9. Infecções mistas nos grupos Diarréia e Controle

Grupo	Infecções mistas* n (%)	
	Presente	**Ausente**
Diarréia	21,6% (21/97)	78,3% (76/97)
Controle	9,5% (27/285)	90,5% (258/285)
Total	12,5% (48/382)	87,4% (334/382)

*valor de p=0,0018

A frequência de cada um dos patotipos nos 48 casos de infecções mistas e as associações entre os patotipos podem ser observadas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10. Frequência de cada patotipo de *Escherichia coli* diarreiogênica encontrado em infecções mistas (n=48) nas crianças quilombolas.

Patotipos	Crianças com infecções mistas n (%)
EAEC	42 (87,5%)
DAEC	31 (64,6%)
aEPEC	22 (45,8%)
tEPEC	3 (6,2%)
ETEC	8 (16,7%)
EIEC	1 (2,1%)

Tabela 11. Infecções mistas de patotipos de *E. coli* diarreiogênica em crianças quilombolas.

Patotipos associados	Número de crianças
EAEC + DAEC	20
EAEC + EPECat	10
EAEC + EPECt	1
EAEC + ETEC	3
EAEC + DAEC + ETEC	3
EAEC + DAEC + EPECat	2
EAEC + DAEC + EIEC	1
EAEC + ETEC + EPECat	1
EPECat + EPECt	1
EPECat + DAEC	5
EPECat + EPECt + ETEC	1
TOTAL	48

5.3.6 Distribuicão dos patotipos de DEC entre familiares

Foram 54 famílias em que mais de uma criança teve sua amostra fecal analisada, com número de crianças nestes casos variando de dois a sete. Destes, em 24,1% (13/54) dos casos houve isolamento de um mesmo patotipo. Nestas 13 famílias, em 69,2% (9/13) o mesmo patotipo foi isolado de amostras controle, e em 30,8% (4/13) o patotipo esteve tanto no familiar com amostra do grupo diarréia quanto do controle. Nos demais 75,9% (41/54) casos, o patotipo de DEC foi isolado de apenas um dos membros ou patotipos distintos foram isolados.

5.3.7 Distribuição de patotipos de *E. coli* diarreiogênica por período de coleta

Os casos em que foram detectados pelo menos um dos patotipos de DEC foram dispostos de acordo com os semestres de suas coletas, diferenciando os grupos diarréico e controle, estão mostrados na Figura 19.

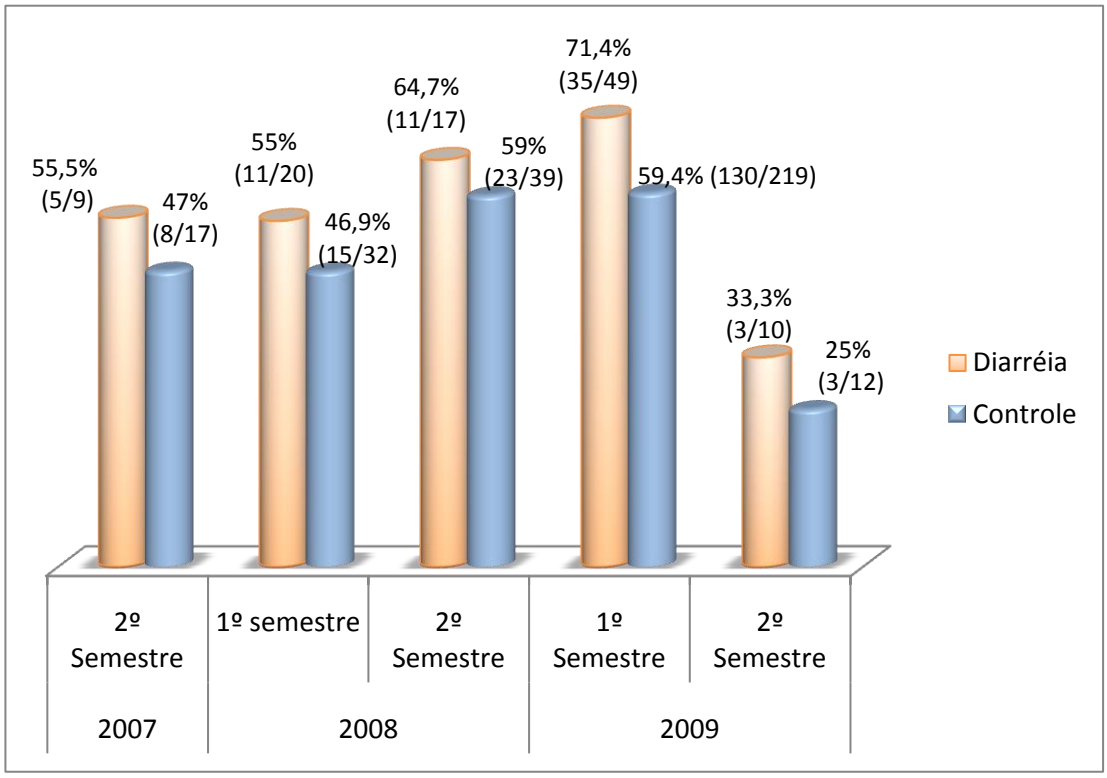

Figura 19. Frequência dos patotipos de DEC conforme períodos de coleta. Gráfico de frequência dos patotipos de DEC nos grupos diarréia e controle, detectados dentre as amostras fecais obtidas, conforme períodos de coleta, variando do segundo semestre de 2007 ao segundo semestre de 2009.

5.3.8 Prevalência de DEC nas diversas faixas etárias

As freqüências dos patotipos de DEC nas diferentes faixas etárias estão demostradas na Tabela 12, com exceção da tEPEC e EIEC, isolada em apenas três e duas amostras, respectivamente. Dentre as freqüências encontradas nos grupos diarréia e controle nas diferentes faixas etárias, a DAEC, foi o único patotipo significantemente associado à diarréia em >3-5 anos (p=0,015).

Tabela 12. A Tabela mostra as freqüências dos patotipos mais comuns de DEC encontrados nos grupos diarréia e controle nas diferentes faixas etárias.

Faixa etária	EAEC			DAEC			EPECat			ETEC		
	Diarréia	Controle	Total	Diarréia	Controle	Total	Diarréia	Controle	Total	Diarréia	Controle	Total
<12 meses	51,6% (16/31)	41,1% (23/56)	44,8% (39/87)	22,6% (7/31)	16,1% (9/56)	18,4% (16/87)	16,1% (5/31)	16,1% (9/56)	16,1% (14/87)	3% (1/31)	1,7% (1/56)	2,3% (2/87)
12-24 meses	30,1% (4/13)	45% (9/20)	39,4% (13/33)	23,1% (3/13)	20% (4/20)	21,2% (7/33)	15,4% (2/13)	5% (1/20)	9,1% (3/33)	- (0/13)	- (0/20)	- (0/33)
>2-3 anos	56.2% (9/16)	63,6% (21/33)	61,2% (30/49)	31,2% (5/16)	18,2% (6/33)	22,4% (11/49)	- 0/16	12,1% (4/33)	8,2% (4/49)	- (0/16)	- (0/33)	- (0/49)
>3-5 anos	55% (11/20)	41,9% (31/74)	44,7% (42/94)	35% (7/20)	12,2% (9/74)	17,2% (17/99)	10% (2/20)	12,2% (9/74)	11,7% (11/94)	5% (1/20)	1,3% (1/74)	2,1% (2/94)
> 5 anos	47% (8/17)	35,3% (36/102)	40% (44/119)	17,6% (3/17)	15,7% (16/102)	15,6% (19/119)	23,5% (4/17)	13,7% (14/102)	15,1% (18/119)	23,5% (4/17)	1% (1/102)	4,2% (5/119)
Total	49,5% (48/97)	42,1% (120/285)	44% (168/382)	25,7% (25/97)	15,4% (44/285)	18,1% (69/382)	15,5% (13/97)	13% (37/285)	13,1% (50/382)	6,1% (6/97)	1% (3/285)	2,3% (9/382)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A diarréia é uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade em crianças a nível mundial (Dennehy, 2005), com especial destaque para regiões de baixo nível de desenvolvimento sócio-econômico, nas quais os reflexos das condições precárias de saneamento básico e o limitado acesso à água potável, por exemplo, são evidenciados pelas elevadas taxas de morbi-mortalidade provocadas por diarréia nestas regiões (Kitagawa et al, 1989; Fagundes-Neto et al, 1999; Rodrigues et al., 2004). Considerando o importante papel dos agentes etiológicos bacterianos nas doenças diarréicas, principalmente nas regiões em desenvolvimento, é importante dizer que as críticas condições higiênico-sanitárias encontradas nessas localidades levam ao aumento da freqüência destes patógenos.

Sabe-se que os patotipos de DEC, dentre os agentes infecciosos bacterianos, são importantes causadores de diarréia e, através de seus diversificados mecanismos de virulência, estão classificados em *E. coli* enteropatogênica típica e atípica (tEPEC e aEPEC), *E.coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica ou produtora de toxina de Shiga (EHEC ou STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998). A identificação destes patotipos depende de métodos fenotípicos, como o teste de aderência em células HEp-2 ou Hela, testes de toxigenicidade e métodos moleculares, como hibridização de DNA e PCR, que dependem de conhecimento especializado e são restritos a laboratórios de pesquisa. Isto limita o conhecimento da participação dos diversos patotipos na gênese da diarréia e sua diferenciação dentre as cepas de *E. coli* constituintes da microbiota normal, sendo a grande maioria dos estudos epidemiológicos envolvendo estes microorganismos, restrita aos principais centros urbanos do Brasil.

O presente estudo investigou a prevalência dos diferentes patotipos de DEC em crianças, com e sem diarréia, provenientes de Comunidades Quilombolas pertencentes aos municípios de São Mateus e Conceição da Barra, localizadas no Norte do Espírito Santo, caracterizadas por precárias condições de higiene e de saneamento básico.

Foram analisadas 425 amostras de fezes provenientes de 25 Comunidades Quilombolas, no período compreendido entre agosto de 2007 a dezembro de 2009.

Dentre estas, destaca-se que um maior número de amostras de fezes foi proveniente das comunidades cuja localização era mais acessível, pela proximidade com o CEUNES-UFES no município de São Mateus, ou que dispunham de ACS, que tinham envolvimento direto com o estudo desenvolvido. Essas comunidades foram Angelim III, Côrrego do Chiado, Dilô Barbosa, Divino Espírito Santo e Palmitinho II, localizadas no município de São Mateus, que representaram 42,8% (182/425) do total das amostras coletadas. Angelim I, Linharinho, Roda d'Água e São Domingos foram as comunidades pertencentes a Conceição da Barra em que mais foram obtidas amostras, 17,2% (73/425).

Consideramos que foi expressivo o número de fezes analisadas no presente estudo, que exigiu que aproximadamente 6.000 km fossem percorridos. Isto foi possível pela parceria com as Secretarias de Saúde destes municípios e as estratégias utilizadas (item 4.2). Apesar do grande número de comunidades participantes, é importante dizer que nem todas elas, localizadas na região, participaram do projeto, sendo os principais motivos a dificuldade de acesso e também, em alguns casos, a não aceitação por parte dos líderes comunitários.

Diante da precariedade de saneamento básico na maioria das Comunidades Quilombolas, a expectativa foi de que patógenos bacterianos e dentre eles as DEC, tivessem prevalência importante, diferente do que vem sendo observada em regiões desenvolvidas no Brasil (Gomes et al., 1989; Rosa et al., 1998; Rodrigues et al., 2002; Scaletsky et al., 2002a; Araujo et al., 2007). Além das DEC, *Shigella* spp e *Salmonella* spp também foram investigadas no presente estudo.

A *Shigella* spp é um patógeno conhecido por causar a desinteria bacilar, uma doença manifestada por diarréia mucosanguinolenta que pode ser grave, destacando-se assim a sua importância nas infecções em crianças, particularmente nos países em desenvolvimento (Ogawa & Sasakawa, 2006). No presente estudo, *Shigella* spp foi isolada em 1,4% (6/425) das crianças. Esta prevalência foi semelhante à descrita em alguns estudos realizados no Brasil, com taxas variando entre 0,5-2%, em São Paulo e Rio de Janeiro (Gomes et al., 1989; Rosa et al., 1998; Rodrigues et al., 2002). Alguns estudos brasileiros mostram freqüências de isolamento de *Shigella* spp superiores à encontrada nas crianças quilombolas, variando de 2,7% a 17,9% (Almeida et al., 1998; Scaletsky et al., 2002b; Orlandi et

al., 2006; Moreno et al., 2010), enquanto outro não relata o isolamento deste patógeno (Scaletsky et al., 2002a). Estudos realizados na Tunísia e Tanzânia encontraram freqüências de isolamento de *Shigella* spp em 4% e 5,4% das crianças com diarréia, respectivamente (Al-Gallas et al., 2007; Moyo et al., 2011).

Apesar da baixa dose infecciosa (DuPont et al., 1989), a relativa baixa prevalência encontrada no presente estudo pode ser devido à sensibilidade da bactéria ao calor e dessecação, que não favorecem a sua persistência nas condições ambientais encontradas. Além disso, apesar da busca por cumprir os critérios que foram estabelecidos para coleta e conservação dos espécimes, é possível que nem todas as amostras tenham sido adequadamente preservadas. E isto terá reflexo mais significativo naqueles enteropatógenos mais susceptíveis.

No presente trabalho, *Salmonella* spp não foi isolada em nenhuma criança. Este patógeno tem sido isolado em taxas que variam de 0,5 a 12% (Gomes et al., 1989, 1991; Rosa et al., 1998; Medeiros et al., 2001; Scaletsky et al., 2002b; Orlandi et al., 2006; Spano et a., 2008).

Amostras de *E. coli,* foram isoladas em 90,5% das amostras de fezes, porcentual pouco superior ao encontrado em Salvador-BA, de 81,7%, em crianças pré-escolares residentes em uma região que estava sendo favorecida com melhorias em saneamento básico (Franzolin et al.; 2005). Patotipos de DEC corresponderam a 63,3% das amostras de *E. coli* isoladas das crianças quilombolas. Este achado mostra uma freqüência de isolamento de DEC muito superior à descrita por alguns estudos realizados no Brasil, que variaram de 21,7-27,6% dentre os isolados de *E. coli* (Regua-Mangia et al., 2004; Franzolin et al.; 2005; Spano et al., 2008). Em um estudo recente de casos e controles realizado em Hanoi-Vietnã, com crianças pré-escolares e moradoras de área periurbana, DEC foi isolada em 23% das crianças estudadas (Hien et al., 2007).

Entre os patotipos de DEC, EAEC foi o mais freqüente, sendo detectada em 39,5% das crianças estudadas. No Brasil, a freqüência de isolamento deste patógeno tem aumentado nos últimos anos. Em um estudo realizado no Rio de Janeiro-RJ, foi verificado que 27,6% das crianças menores de três anos de idade apresentavam amostras de EAEC (Regua-Mangia et al., 2004). Em outro estudo realizado em João

Pessoa-PB, EAEC foi encontrado em 25% das crianças e associado significantemente com diarréia (Moreno et al., 2010). Estudos realizados em outras regiões do mundo também evidenciaram EAEC como o patotipo mais prevalente, o que sustenta a emergência deste patotipo (Moyo et al., 2007; Hien et al., 2008; Ochoa et al., 2009; Usein et al., 2009; Vilchez et al., 2009, Rajendran et al., 2010; Garcia et al., 2011).

EAEC foi encontrado em 49,5% e 42,1% das crianças com e sem diarréia, respectivamente. Embora isolada em freqüência maior no grupo diarréico, a EAEC não foi associada estatísticamente à diarréia neste estudo, mesmo quando analisados os achados em crianças de até cinco anos de idade (dados não mostrados), indo ao encontro de alguns estudos realizados no Brasil e em outros países (Gomes et al., 1989; Cravioto et al., 1991; Scaletsky et al., 2002b; Regua-Manguia et a., 2004; Hien et al., 2007; Spano et al., 2008). Contrariamente, outros estudos realizados no nordeste do Brasil e em países como Mongólia e Estados Unidos demonstraram a associação de EAEC com a diarréia infantil (Sarantuya et al., 2004; Cohen et al., 2005, Moreno et al., 2010). Alguns estudos em países desenvolvidos mostraram EAEC associada à diarréia em adultos (Huang et al., 2006b; Cennimo et al., 2009).

A patogênese da EAEC é caracterizada pela formação de um espesso biofilme e pelo aumento da secreção de muco pelo epitélio intestinal (Nataro & Kaper, 1998; Mohamed et al., 2007). Esse aspecto pode representar uma prolongada colonização pela bactéria e episódio diarréico persistente ou, mesmo sem diarréia, comprometer o estado nutricional, principalmente de crianças (Huang et al., 2006a; Weintraub, 2007). Isto porque, hospedeiros mal nutridos, especialmente crianças, podem apresentar dificuldade de reparo aos danos na mucosa causada pela infecção ou colonização (Huang et al., 2004; Huang & Dupont, 2004b). Logo, a elevada prevalência de EAEC observada na população estudada, mesmo que não tenha sido associada à diarréia, indica, pelo menos, uma taxa de colonização significativa e merece atenção.

Por outro lado, as cepas de EAEC são reconhecidas por sua notável heterogeneidade, constituídas por uma diversidade de sorotipos e uma grande variedade de genes de virulência, como *aggR, aap, aggA, aafA, astA aatA* (Nataro et

al., 1994; Huppertz et al.,1997; Spencer et al., 1999; Okeke et al., 2000; Suzart et al., 2001; Elias et al., 2002; Nishi et al.,2003; Kahali et al., 2004; Jekins et al. 2005, Uber et al., 2006). Essa heterogeneidade encontrada em cepas de EAEC não exclui a possibilidade da associação de EAEC com a diarréia na população estudada. Para avaliar isto, a análise da expressão dos genes de virulência e da capacidade de formação de biofilme pelas cepas isoladas das crianças com e sem diarréia trariam informações relevantes quanto à possível relação com a gênese da diarréia.

Métodos moleculares desenvolvidos para diagnóstico como o teste de hibridização de DNA e a PCR para pesquisa do plasmídio de aderência pAA (também designado pCVD432 na amostra protótipo de EAEC 17-2) vêm sendo utilizados largamente na detecção de EAEC (Baudry et al., 1990; Schmidt et al., 1995; Nataro & Kaper, 1998), o que tem representado alternativas à utilização do teste de adesão em células HEp-2, padrão ouro na identificação dos patotipos. Entretanto, nem todas as amostras de EAEC possuem o plasmídio pAA, apontando ainda mais para a heterogeneidade dentro do patotipo (Huppertz et al.,1997; Nataro & Kaper, 1998; Suzart et al., 2001; Elias et al., 2002; Kahali et al., 2004). Este fato limita a identificação da EAEC pelos procedimentos moleculares, como hibridização de DNA e PCR, podendo subestimar, assim, sua prevalência nos estudos que empregam somente estas técnicas. Sendo assim, a elevada taxa com que a EAEC foi encontrada, superior ao que vem sendo mostrado em estudos no Brasil (Gomes et al., 1989; Scaletsky et al., 2002b; Regua-Manguia et a., 2004; Orlandi et al., 2006; Spano et al., 2008), pode ser explicada não só pelo aspecto sócio-demográfico das Comunidades Quilombolas, mas também pelo fato de que foi utilizada o teste padrão ouro na identificação da EAEC .

No presente estudo, cepas de EAEC foram identificadas pelo padrão de adesão AA e submetidas a ensaios de hibridização de DNA e PCR para detecção do plasmídio pAA. Das 168 cepas de EAEC identificadas pelo padrão AA, 40,5% foram positivos no PCR e 25,6% reagiram com a sonda genética para pesquisa do plasmídio pAA. Ambos os ensaios de PCR e hibridização de DNA apresentaram uma sensibilidade baixa na detecção de EAEC. Por outro lado, a especificidade observada para ambos os ensaios foi relativamente elevada, de 94,4% e 98,6%, respectivamente.

A porcentagem de amostras de EAEC portadoras deste plasmídio varia de acordo com o grupo de amostras em estudo. PCR com os iniciadores CDV432, positivo em

40,5% das amostras de EAEC, revelam a característica dessas cepas isoladas das crianças quilombolas e da limitação desta técnica, cuja sensibilidade de detecção tem sido mostrada variar, de acordo com a área geográfica, de 15 a 90% (Fang et al., 1995; Faruque et al., 1995; Gomes et al., 1998; Gioppo et al., 2000; Okeke et al., 2000; Okeke & Nataro, 2001; Scaletsky et al., 2002c).

Entretanto, os resultados com a sonda genética pAA em 25,6% das EAEC no presente estudo, representam um achado importante, considerando que estudos têm evidenciado sensibilidade significativamente mais alta, próxima de 50% (Gomes et al., 1998; Scaletsky et al., 2002c), o que reforça a característica das cepas isoladas e a importância do teste de adesão em células HEp-2 na identificação deste patotipo.

Vale à pena mencionar o encontro de 5% de amostras de *E. coli* apresentando o padrão de adesão CLA, caracterizado pela formação de longas cadeias de bactérias, tanto na lâmina quanto na superfície das células HEp-2/HeLa (Gomes et.al., 1998). Esse padrão de adesão tem sido considerado como uma variante do padrão AA apresentado por amostras de EAEC (Gioppo et al., 2000). No presente estudo, nenhuma das cepas apresentando o padrão CLA foi identificada como EAEC pelos ensaios de PCR e de hibridização.

DAEC foi o segundo patotipo de DEC mais prevalente, encontrado em 18,1% da população estudada. Este achado está de acordo com outros estudos realizados no Brasil, que encontraram freqüências de isolamento de DAEC entre 8,5% a 19% (Rosa et al., 1998; Scaletsky et al., 2002a, 2002b; Spano et al., 2008). DAEC foi o único patotipo associado significantemente com diarréia ($p=0,022$), detectado em 23,6% e 13,8% nas crianças com e sem diarréia, respectivamente. Estudos de casos e controles realizados no Brasil mostraram associação da DAEC com diarréia infantil em crianças >12 meses ou em < 24 meses (Scaletsky et al., 2002b; Spano et al., 2008). Em outros países sul-americanos como Peru e Chile, foi demonstrado um risco maior de diarréia por DAEC com aumento da idade e nível sócio-econômico baixo (Levine et al., 1993; Ochoa et al., 2009). Entretanto, considerando apenas os casos em que a DAEC foi isolada como único patotipo (dados não mostrados) observou-se que ele não foi estatisticamente associado à diarréia ($p>0,05$). A implicação da DAEC na diarréia permanece controversa, com freqüências de

isolamento semelhantes tanto em crianças com e sem diarréia (Gunzburg et al., 1993, Germani et al., 1996; Albert et a., 1999, Scaletsky et al., 2002a).

A pesquisa de DAEC foi realizada pelo teste de adesão, no qual se verifica o padrão de adesão AD, característico deste patotipo, e pelo teste de hibridização com a sonda genética *afaBC* (também designado de *daaC* na amostra protótipo de DAEC C1845), relacionada à família de adesinas afimbriais Afa/Dr. Dentre as 69 DAEC isoladas, 49,3% foram positivas com a sonda *afaBC*. Ensaios de hibridização de DNA (Bilge et al., 1989; Nowicki et al., 1989) e PCR (Le Bouguenec et al., 1992, 2001) têm sido utilizados na pesquisa do gene *afaBC* ou *daaC* pela maioria dos estudos epidemiológicos para identificação de DAEC tanto na doença diarréica como nas infecções do trato urinário (Foxman et al., 1995; Forestier et al., 1996; Gomes et al., 1998; Albert et al., 1999; Campos et al., 1999; Fabrega et al., 2002). Aproximadamente 75% das amostras de DAEC reagem com a sonda *daaC*, relacionada à presença da adesina F1845 ou adesina relacionada (Natato & Kaper, 1998). Esta sonda apresentou 64,3% de sensibilidade e 95,7% de especificidade quando testada com amostras de DAEC isoladas de diferentes cidades brasileiras (Scaletsky et al. 2000a, 2000b, 2000c). No presente estudo, 52,9% cepas de DAEC foram identificadas através da sonda *afaBC*, mostrando 49,3% e 98,4% de sensibilidade e especificidade, respectivamente.

Portanto, a diversidade genética de cepas pertencentes ao patotipo DAEC tem apontado para limitações importantes das técnicas moleculares que vem sendo utilizadas largamente em estudos epidemiológicos em todo o mundo, fato este, que pode colaborar com as divergências mostradas pelos estudos, no que diz respeito à sua associação com diarréia, e sustenta a necessidade de mais estudos para esclarecimento do papel patogênico da DAEC na etiologia da doença diarréica e da caracterização genética do patotipo.

Os genes *eae* e *bfpA*, relacionados a adesão íntima seguida da destruição das microvilosidades dos enterócitos, têm sido usados para classificar as amostras de EPEC em dois subgrupos: tEPEC (*eae*+ *bfpA*+) e aEPEC (*eae*+ *bfpA*-). No presente estudo, dentre as 53 cepas de EPEC presentes em 51 crianças, 94,3% (50/53) e 5,7% (3/53) foram classificadas como aEPEC e tEPEC, respectivamente.

A prevalência de aEPEC em nosso estudo, o terceiro patotipo mais freqüente, foi maior do que a relatada nos principais centros urbanos do Brasil, com taxas variando de 2,8% a 10,1% (Scaletsky et al., 2002a, 2002b; Regua-Mangia et al., 2004; Franzolin et al., 2005; Spano et al., 2008) e em outras regiões do mundo, taxas variando de 3,6 a 9,5% (Vargas et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Al-Gallas et al., 2007; Hannaoui et al., 2010).

As freqüências de aEPEC foram semelhantes em crianças com e sem diarréia, 13,4% e 13%, respectivamente ($p>0,05$). Essa ausência de relação com diarréia também foi observado em um estudo de casos e controles com crianças menores de três anos de idade, atendidas em Pronto-Socorro de hospital pediátrico em Vitória-ES (Spano et al., 2008). Apesar de não estar associada com diarréia na população estudada, estudos recentes têm relatado o crescente envolvimento de aEPEC como causa de diarréia, não apenas em nosso meio, como também em outros países (Robins-Browne et al., 2004; Nguyen et al., 2006, Estrada-Garcia et al., 2009; Amisano et al., 2011; Vieira et al., 2001, Dulguer et al., 2003; Gomes et al., 2004; Moreno et al., 2010). Amostras de aEPEC têm substituído, em termos de freqüência, vários outros patógenos causadores de diarréia, incluindo entre estes a própria tEPEC. Entretanto, é preciso considerar que o papel patogênico da aEPEC permanece controverso.

A tEPEC, anteriormente considerada uma importante causa de diarréia infantil em lactentes no Brasil e em países em desenvolvimento (Oliva et al., 1997; Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi et al., 2002; Moyo et al., 2007), apresentou neste estudo prevalência de 0,8%. Nossos resultados concordam com diversos estudos em diferentes regiões geográficas, mostrando que a frequência de tEPEC vem diminuindo drasticamente nos últimos anos (Girão et al., 2001; Da Silva Duque et al., 2002; Rodrigues et al., 2002; Franzolin et al., 2005; Bueris et al., 2007; Ochoa et al., 2009, Hannaoui et al., 2010).

Dentre as três amostras de tEPEC isoladas nesse estudo, apenas uma foi proveniente de uma criança > 1 ano com diarréia sendo as outras duas de crianças > 5 anos sem diarréia. Estes dados mostram, claramente, que mesmo com as características da região estudada, a freqüência de tEPEC foi compatível com a descrita em outras regiões mais desenvolvidas do Brasil, apresentando baixa

prevalência e não associada à diarréia infantil (Rodrigues et al., 2002; Franzolin et al., 2005; Spano et al., 2008).

A ETEC foi encontrada neste estudo em 2,3% das amostras analisadas, 6,2% e 1% nas crianças com e sem diarréia, respectivamente. Embora a ETEC seja considerada importante patotipo associado à diarréia infantil em regiões endêmicas, a freqüência de isolamento desse patotipo no presente estudo está em conformidade com outros estudos epidemiológicos realizados no Brasil e em outros países, que apresentam uma freqüência de ETEC variando de 1,2% a 7,5% (Lima et al., 2000; Regua-Mangia et al., 2004; Franzolin et al., 2005; Araujo et al., 2007, Hien et al., 2008; Spano et al., 2008; Nair et al., 2010; Rajendran et al., 2010, Garcia et al., 2011). Em um estudo na cidade do Rio de Janeiro, Regua-Mangia e colaboradores (2004) encontraram uma freqüência de isolamento de ETEC em 3,5% e 5,5% das crianças com e sem diarréia, respectivamente. Em outro estudo na cidade de Vitória-ES, Spano et al. (2008) evidenciaram ETEC em 3,2% e 1,2% das crianças com e sem diarréia, respectivamente.

O diagnóstico de ETEC é feito pela pesquisa dos genes que codificam as toxinas LT e/ou ST ou através de métodos biológicos (Nataro & Kaper, 1998). No presente estudo, utilizando PCR, foram identificadas em todas as nove amostras de ETEC o gene para LT, enquanto duas destas foram portadoras dos genes que codificam LT e ST. Resultados de outros estudos no Brasil também têm descrito que a maioria das cepas isoladas de ETEC é portadora do gene para a LT, sendo o gene para ST menos frequente, variando de 66,7% a 87,5% e de 12,5% a 44,4%, respectivamente (Regua-Mangia et a., 2004; Franzolin et al., 2005; Spano et al., 2008).

A frequência de isolamento de EIEC encontrada nesta pesquisa (0,5%), sendo uma amostra isolada de cada grupo, é comparável a outros estudos realizados recentemente em diferentes cidades brasileiras (Orlandi et al., 2001; Souza et al., 2002; Regua-Mangia et al., 2004, Orlandi et al., 2006; Spano et al., 2008; Moreno et al., 2010). Dois estudos realizados em área suburbana de Hanoi-Vietnã e Índia encontraram freqüência baixa de isolamento de EIEC de 1,8% e 1%, respectivamente (Hien et al., 2007; Rajendran et al., 2010). Em outros estudos no Brasil e Tanzânia, não foi encontrada nenhuma amostra de EIEC (Scaletsky et al. 2002b; Moyo et al., 2007; Garcia et al., 2011).

EHEC não foi isolada no presente estudo. Este resultado confirma o perfil epidemiológico no Brasil, com baixa prevalência ou relatos de infecções esporádicas (Almeida et al., 1998; Cantarelli et al., 2000; Guth et al., 2002; Frazolin et al., 2005; Orlandi et al., 2006). Em estudo de casos e controles realizado em Vitória-ES com 304 crianças, sendo 218 crianças com diarréia, este patotipo também não foi encontrado (Spano et al., 2008). Por outro lado, estudo realizado recentemente por nosso grupo de pesquisa em crianças residentes na periferia do Município de Conceição da Barra, revelou a presença de STEC em uma criança com diarréia (dados não publicados).

As infecções mistas, com até três patotipos de DEC, foram observadas neste estudo em 12,6%, sendo 21,6% e 9,5% nas crianças com e sem diarréia respectivamente. Essa diferença considerada estatisticamente significante (p=0,0018) mostra a associação das infecções mistas com diarréia na população estudada. A maioria destas infecções, 83,3%, foi com dois patotipos, enquanto os restantes 16,7%, foram com três patotipos. Outros estudos recentes também relataram a associação de infecções mistas com diarréia (Orlandi et al., 2006; Ochoa et al., 2009; Moyo et al., 2011).

O presente estudo realizado em crianças quilombolas que vivem em precárias condições de higiene e saneamento básico, mostrou que apesar da alta prevalência dos diferentes patotipos de DEC encontrados, com exceção da DAEC, nenhum outro patotipo revelou-se associado com diarréia. Entretanto, as infecções mistas foram comuns e associadas com diarréia. Mesmo que a EAEC não tenha apresentado associação com diarréia, sua freqüência de isolamento foi alta, evidenciando o elevado número de crianças colonizadas por esse patotipo. Além disso, a alta frequência de isolamento de cepas EAEC não portadoras do plasmídio pAA mostra a peculiaridade desse patotipo na população estudada.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- Patotipos de DEC foram isolados em alta prevalência na população estudada, sendo EAEC, DAEC e aEPEC os mais frequentes;
- DAEC tem papel relevante na diarréia nas comunidades em estudos;
- Embora isoladas em alta prevalÊncia, EAEC e aEPEC não foram associadas com diarréia
- EAEC, identificado pelo padrão AA, foi o patotipo mais freqüente em ambos os grupos de crianças, apresentando taxa de isolamento superior a outros relatos do Brasil; ensaios de PCR e hibridização de DNA apresentaram sensibilidade baixa na detecção de EAEC;
- Infecções mistas foram encontradas significantemente mais freqüentes em crianças com diarréia do que em crianças sem diarréia.

8 PERSPECTIVAS

8 PERSPECTIVAS

- Caracterização fenotipica e genotipica de marcadores de virulência relacionados à patogênese de EAEC e DAEC.

- Determinação da resistência antimicrobiana das cepas de EAEC e DAEC.

- Verificar a presença de plasmídios comuns que possam estar associados com o padrão de adesão AA.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

Abduch-Fabrega VL, Piantino-Ferreira AJ, Reis da Silva Patrício F, Brinkley C, Scaletsky ICA. Cell detaching *Escherichia coli* (CDEC) strains from children with diarrhea: identification of a protein with toxigenic activity. FEMS Microbiol Lett 2002, 217:191-197.

Adachi JA, Jiang ZD, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martinez-Sandoval F, Steffen R, Ericsson CD, DuPont HL.. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiological agent in traveller's diarrhoea in three regions of the world. Clin Infect Dis 2001, 32:1706–1709.

Albert MJ, Faruque AS, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. J Clin Microbiol 1999, 37:3458-64.

Albert MJ, Rotimi VO, Dhar R, Silpikurian S, Pacsa AS, Molla AM, Szucs G. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* are not a significant cause of diarrhoea in hospitalised children in Kuwait. BMC Microbiol 2009, 9:6.

Al-Gallas N, Bahri O, Bouratbeen A, Ben Haasen A, Ben Aissa R. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. Am J Trop Med Hyg. 2007, 77:571-82.

Allen-Vercoe E, Waddell B, Toh MC, DeVinney R. Amino acid residues within enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 Tir involved in phosphorylation, alpha-actinin recruitment and Nck-independent pedestal formation. Infect Immun 2006, 74:6196-6205.

Allos BM. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis. 2001, 32:1201-1206

Almeida MTG, Silva RM, Donaire lM, Moreira lE, Martinez MB. Enteropatógenos associados com diarréia aguda em crianças. Jornal de Pediatria 1998, 74:291-298.

Amirlak I, Amirlak B. Haemolytic uraemic syndrome: an overview. Nephrology 2006, 11: 213-218.

Amisano G, Fornasero S, Migliaretti G, Caramello S, Tarasco V, Savino F. Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy New Microbiol. 2011, 1:45-51.

Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. J Clin Microbiol 2004, 42: 5849-5853.

Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR, Fabbricotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, Scaletsky IC. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. J. Clin. Microbiol 2007, 45:3396-3399.

Baqui AH, Zaman K, Yunus M, Mitra AK, Hossain KM, Banu H. Epidemiological and clinical characteristics of shigellosis in rural Bangladesh. J Diarrhoeal Dis. 1988, 6: 21-8.

Barletta F, Ochoa TJ, Ecker L, Gil IA, Lanata CF, Cleary TG. Validation of Five-Colony Pool Analysis Using Multiplex Real-Time PCR for Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of clinical microbiology 2009, 46: 1915-1917.

Baudry B, Savarino SJ, Vial P, Kaper JB, Levine MM. A sensitive and specifc DAN probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. Inf disease 1990, 161:1249-1251.

Baudry B, Maurelli AT, Clerc P, Sadoff JC, Sansonetti PJ. Localization of plasmid loci necessary for the entry of *Shigella* flexneri into HeLa cells, and characterization of one locus encoding four immunogenic polypeptides. J. Gen. Microbiol 1987, 133: 3403–3413.

Baudry, B, Savarino SJ, Vial P, Kaper JB, Levine MM. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. J Infect Dis 1990, 161: 1249–1251.

Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barrett TJ, Wells JG, Baron R, Kobayashi J. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. the Washington experience. JAMA 1994, 272:1349-1353.

Bellin T, Pulz M, Matussek A, Hempen HG, Gunzer F. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. J. Clin. Microbiol 2001, 39: 370–374.

Benz I, Schmidt MA. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun 1989, 57: 1506–1511.

Bernet-Camard MF, Coconnier MH, Hudault S, Servin AL. Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. Infect. Immun 1996, 64: 1918–1928.

Bernier C, Gounon P, Le Bouguénec C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. Infect Immun. 2002, 70:4302-11.

Bhan MK, Bhandari N, Sazawal S, Clemens J, Raj P, Levine MM, Kaper JP. Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural northern India. Bulletin of the World Health Organization 1989a, 67:281–288.

Bhan, M. K., Raj, P., Levine, M. M., Kaper, J. B., Bhandari, N.,Srivastava, R., Kumar, R. & Sazawal, S.. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. J Infect Dis 1989b, 159: 1061–1064.

Bilge SS, Clausen CR, Lau W, Moseley SL. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. J. Bacteriol 1989, 171:4281– 4289.

Birnboim HC, Doly J. A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979, 7:1513–1523.

Blanco J, Blanco M, Garabal JI, González EA. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. Microbiologia 1991, 7:57-73.

Black RE. Epidemiology of travellers' diarrhea and relative importance of various pathogens. Rev Infect Dis 1990, 12:73-79.

Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. Bull World Health Organ, 2008, 86: 710–717.

Boyd B, Lingwood C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. Nephron 1989, 51:207–210.

Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of Bact. colineapolitanum from summer diarrhoea of infants. Journal of Pathology and Bacteriology 1945, 57:239-247.

Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. J. Infect. Dis 2005, 192:1422–1429.

Bueno Eduardo Brasil: uma História - a incrível saga de um país. São Paulo: Ática, 2003.

Campellone KG. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFu and actin pedestal assembly. FEBS J 2010, 277: 2390–2402.

Campellone KG, Brady MJ, Alamares JG, Rowe DC, Skehan BM, Tipper DJ, Leong JM. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Tir requires a C-terminal 12-residue peptide to initiate EspF-mediated actin assembly and harbours N-terminal sequences that influence pedestal length. Cell Microbiol 2006, 8: 1488–1503.

Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the traditional Enteropathogenic E. coli O Serogroups – A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004, 99: 545-552.

Caprioli A, Morabitoa S, Brugèreb H, Oswaldb E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Veterinay research 2005, 36: 298-311.

Cennimo D, Abbas A, Huang D B, Chiang T. The prevalence and virulence characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* at an urgentcare clinic in the USA: a case–control study. Journal of Medical Microbiology 2009, 58: 403–407.

Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 2003, 41: 2138–2140.

Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. FEMS Microbiol 2005, 29:83–98.

Clarke, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emerging problem? Diagn Microbiol Infect Dis 2001, 41:93–98.

Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiology 2004, 150: 527-538.

Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. J Pediatr. 2005, 146(1):54-61.

Cooling LL, Walker KE, Gille T, Koerner TA. Shiga toxin binds human platelets via globotriaosylceramide (Pk antigen) and a novel platelet glycosphingolipid. Infect Immun 1998, 66: 4355-4366.

Cobeljić M, Miljković-Selimović B, Paunović-Todosijević D, Velicković Z, Lepsanović Z, Zec N, Savić D, Ilić R, Konstantinović S, Jovanović B, Kostić V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. Epidemiol Infect 1996, 117: 11–16.

Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafán H, Uribe F, Eslava C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet 1991, 337: 262-264.

Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol 1979, 3:95-99.

Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010, 8:26-38.

Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1997, 65:4135-45.

Czeczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. Infect Immun. 1999,67:2692-9.

Dallas WS, Falkow S. Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. Nature 1980, 288: 499-501.

Drasar BS, HillHuman MJ. Intestinal flora. Academic Press, Ltd. London United Kingdom: 1974, p. 36–43.

Dudley EG, Abe C, Ghigo JM, Latour-Lambert P, Hormazabal JC, Nataro JP. An IncI1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. Infect Immun 2006, 74: 2102–2114.

DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. J. Infect. Dis. 1989, 159:1126-1128

Dutta PR, Cappello R, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. Infect Immun 2002, 70: 7105-7113.

Edelman R, Levine MM. Summary of a workshop on entero pathogenic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis 1983, 147:1108-1118.

Edwards PR, Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Co, Minneapolis, Minn. 1972.

Egile C, Loisel TP, Laurent V, Li R, Pantaloni D, Sansonetti PJ, Carlier MF. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella* flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. J Cell Biol. 1999, 146:1319-32.

Elliott EJ. Acute gastroenteritis in children. Clinical Research 2007. v7583: 35-40.

Evans DG, Evans DJ, Pierce NF. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1973, 7:873–880.

Evans DG, Evans DJ Jr, Tjoa WS, DuPont HL. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. Infect. Immun 1978, 19:727–736.

Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. Sao Paulo Med. J 2000, 118:21–29.

Fang GD, Lima AA, Martins CV, Nataro JP, Guerrant RL. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 1995, 21: 137–144.

Farmer JJ, III. 1999. Enterobacteriaceae: introduction and identification, p. 442–458. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Faruque SM, Haider K, Rahman MM, Abdul Alim AR, Baqui AH, Ahmad QS, Hossain KM, Albert MJ. Evaluation of a DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli* from children with diarrhoea in Bangladesh. J Diarrhoeal Dis Res. 1992, 10(1):31-4

Faundez G, Figueroa G, Troncoso M, Cabello FB. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. J Clin Microbiol 1988, 26: 928-932.

Franzolin MR, Alves RC, Keller R, Gomes TA, Beutin L, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Ribeiro H,Trabulsi LR. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador,Bahia, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2005, 100: 359–363.

Fukuta S, Magnani JL, Twiddy EM, Holmes RK, Ginsburg V. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. Infect Immun. 1988, 56:1748-53.

Gallas A N, Bahri O, Bouratbeen A, Haasen AB, Aissa RB. Etiology of Acute Diarrhea in Children and Adults in Tunis, Tunisia, with Emphasis on Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence, Phenotyping, and Molecular Epidemiology. Am. J. Trop. Med. Hyg 2007, 77(3): 571–582.

Garcia PG, Silva VL, Diniz CG. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. J Microbiol. 2011, 49: 46-52.

Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*infections: translocation, translocation, translocation. Infect. Immun 2005, 73:2573–2585.

Gassama-Sow A, Sow PS, Guèye M, Guèye-N'diaye A, Perret JL, M'boup S, Aïdara-Kane A. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. J Infect Dis. 2004, 189(1):75-8.

Germani Y, Bégaud E, Duval P, Le Bouguénec C. Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregative, and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in new Caledonia. J Infect Dis. 1996, 174(5):1124-6.

Germani Y, Begaud E, Duval P & Le Bouguenec C. An *Escherichia coli* clone carrying the adhesin-encoding afa operon is involved in both diarrhoea and cystitis in twins. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997, 91: 573.

Gicquelais K G, Baldini M M, Martinez J, Maggi L Martin, W C, Prado V, Kaper J B, and M M. Levine Practical and economical method for using biotinylated DNA probes with bacterial colony blots to identify diarrhea-causing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 1990, 28(11): 2485–2490.

Giles C, Sangster G. An outbreak of infantile gastroenteritis in Aberdeen. J Hyg 1948, 46:1-9.

Gill DM, Richardson SH. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. J. Infect. Dis. 1980, 141:64–70.

Giono S, Rodríguez-Angeles G, Rodríguez MJ, Valdespino JL. Identificación de enterotoxinas y citotoxinas de E. coli por cultivo de células Vero e hibridación en fase sólida (Colony blot). Rev Latinoam Microbiol 1994, 36: 231-241.

Gioppo NM, Elias WP Jr, Vidotto MC, Linhares RE, Saridakis HO, Gomes TA, Trabulsi LR, Pelayo JS. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative E. coli and chain-like adherent E. coli isolated

from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. FEMS Microbiol Lett. 2000, 190(2):293-8.

Girón JA, Jones T, Milla´n-Velasco F, Munoz EC, Zarate L, Fry J, Frankel G, Moseley SL, Baudry B, Kaper JB, Schoolnik GK, Riley LW. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. J. Infect. Dis. 1991, 163:507–513.

Goldberg MB, Sansonetti PJ. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. Infect. Immun. 1993, 61:4941–4946.

Goldberg MB, Barzu O, Parsot C, Sansonetti PJ. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella* flexneri protein involved in intracellular movement. J. Bacteriol. 1993, 175:2189–2196.

Gomes TA, Blake PA, Trabulsi LR. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. J Clin Microbiol. 1989, 27(2):266-9.

Gomes TAT, Rassi V, MacDonald KL, Ramos SR, Trabulsi LR, Vieira MA. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. J Infect Dis 1991, 164: 331-337.

Gomes TAT, Suzart S, Guth BEC, Abe CM, Pedroso MZ. Distinctive pattern of adherence to HeLa cells. Abstract in the ASM 98th General Meeting 1998, D-114, Atlanta, GA.

Gordillo ME, Reeve GR, Pappas J, Mathewson JJ, DuPont HL, Murray BE. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. J. Clin. Microbiol. 1992, 30:889–893.

Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG. Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* by Use of Melting-Curve Analysis and Real-Time Multiplex PCR. Journal of clinical microbiology 2008, 1752–1757.

Gunzburg ST, Chang BJ, Elliott SJ, Burke V, Gracey M. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. J Infect Dis. 1993, 167(3):755-8.

Gunzburg, S. T., N. G. Tornieporth, and L. W. Riley. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle- forming pilus gene. J. Clin. Microbiol. 1995, 33:1375–1377.

Guth BE, Ramos SR, Cerqueira AM, Andrade JR, Gomes TA. Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in Sao Paulo, Brazil, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002 97: 1085-1089.

Gyles CL. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. Can J Microbiol. 1992, 38(7): 734-46.

Hale, T. L., E. V. Oaks, and S. B. Formal. 1985. Identification and antigenic characterization of virulence-associated, plasmid-coded proteins of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. Infect. Immun. 50:620–629.

Hannaoui E, Villalobos L, Martínez R, Maldonado A, Hagel I, Bastardo J. Diarrheagenic *Escherichia coli* associated with acute diarrhea in children of Cumana, Venezuela. Invest Clin. 2010, 51(4):489-500

Harhay MO, Horton J, Olliaro PL. Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010, 8(2): 219–234.

Harrington SM, Strauman MC, Abe CM, Nataro JP. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. Cell Microbiol 2005, 7: 1565–1578.

Hasan, R. J. et al. Structure–function analysis of decayaccelerating factor: identification of residues important for binding of the *Escherichia coli* Dr adhesin and complement regulation. Infect. Immun. 2002,70: 4485–4493.

Hayward RD, Leong JM, Koronakis V, Campellone KG. *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. Nat Rev Microbiol 2006, 4(5):358-70.

Heczko U, Carthy CM, O'Brien BA, Brett Finlay B. Decreased apoptosis in the ileum and ileal Peyer's patches: a feature after infection with rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* O103. Infect. Immun 2001, 69:4580–4589.

Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella* flexneri and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun 1999, 67: 5587–5596.

Hien BT, Trang do T, Scheutz F, Cam PD, Mølbak K, Dalsgaard A. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and other causes of childhood diarrhoea: a case-control study in children living in a wastewater-use area in Hanoi, Vietnam. J Med Microbiol. 2007, 56:1086-96

Hien BT, Scheutz F, Cam P, Huong T, Thu T, Dalsgaard A. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* Strains Isolated from Children in a Hospital Case-Control Study in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol. 2008, 46(3): 996–1004.

Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. Lancet 2009, 373: 1570–1575.

Huang DB, Okhuysen PC, Jiang ZD, DuPont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. Am J Gastroenterol 2004(a), 99: 383–389.

Huang DB, Dupont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. Semin Pediatr Infect Dis 2004(b),15: 266–271.

Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 2006a, 55:1303-11.

Huang DB, Nataro JP, DuPont HL, Kamat PP, Mhatre AD, Okhuysen PC, Chiang T. Enteraggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2006b, 43: 556–563.

Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J. Escherichia albertii sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003, 53:807–810.

Instituto Brasileiro de geografia e estatística (IBGE). Área territorial oficial. Resolução da Presidência do IBGE de n° 5 (R.PR-5/02), 2002.

Ito K, Iida M, Yamazaki M, Moriya K, Moroishi S, Yatsuyanagi J, Kurazono T, Hiruta N, Ratchtrachenchai OA. Intimin types determined by heteroduplex mobility assay of intimin gene (eae)-positive *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 2007, 45:1038-41.

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

Jafari F, Hamidian M, Rezadehbashi M, Doyle M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Derakhshan F, Reza Zali M. Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2009, 20(3):56-62.

Jallat C, Livrelli V, Darfeuille-Michaud A, Rich C, Joly B. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. J Clin Microbiol. 1993, 31:2031-7.

Jenkins C, Ijperen C, Dudley EG, Chart H, Willshaw GA, Cheasty T, Smith HR, Nataro JP. Use of a microarray to assess the distribution of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 2005, 253: 119–124.

Jenkins C, Chart H, Willshaw GA, Cheasty T, Smith HR. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. Diagn Microbiol Infect Dis 2006a, 55: 13–19.

Jenkins C, Tembo M, Chart H, Cheasty T, Willshaw G., Phillips AD, Tompkins D, Smith H. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. J Med Microbiol 2006b, 55: 1493–1497.

Jiang ZD, Greenberg D, Nataro JP, Steffen R, DuPont HL. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence actors in international travelers. J Clin Microbiol 2002, 40: 4185–4190

Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. Microbiology and molecular biology reviews 2009, 750–774.

Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, Khanam J, Yamasaki S, Nandy RK, Bhattacharya, SK, Ramamurthy T. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. J Clin Microbiol 2004, 42: 4111–4120.

Kalman D, Weiner OD, Goosney DL, Sedat JW, Finlay BB, Abo A, Bishop JM. Enteropathogenic E. coli acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. Nature Cell Biol. 1999,1: 389–391.

Kaper JB Defining EPEC. In: Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Rev Microbiol 1996, 27:130–3.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004, 2:123-40.

Karmali, M. A., B. T. Steele, M. Petric, and C. Lim. 1983. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxinproducing *Escherichia coli* in stools. Lancet i:619–620.

Kauffmann F, DuPont A. Escherichia strains from infantile epidemic gastroenteritis. Acta athologica et Microbiologica Scandinavica 1950, 27:552-64.

Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell 1997, 91: 511–520.

Kitagawa SMS, Toledo MRF, Trabulsi LR, Ramos Srts, Murahovschi J, Fagundes-Neto U, Candeias JA. Etiologia da diarréia infecciosa endêmica da criança de baixo nível sócio-econômico em São Paulo. Rev. Paul. Pediatr.1989, 7 (24):16-25.

Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1989, 57: 1290-1298.

Knutton S, Phillips AD, Smith HR, Gross RG, Shaw R, Watson P, Price E. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actinstaining test. Infect. Immun. 1991, 59: 365-371.

Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1977, 18:775–779.

Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated form studies published between 1992 and 2000. Bull WHO 2003, 81: 197-204.

Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ. 1999, 77(8):651-66.

Labigne-Roussel AF, Lark D, Schoolnik G, Falkow S. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (Afa-I) responsible for P blood group-independent, mannoseresistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. Infect Immun 1984, 46: 251–259.

Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992, 30: 1189–1193.

Le Bouguenec C, Garcia MI, Ouin V, Desperrier JM, Gounon P, Labigne A. Characterization of plasmid-borne afa-3 gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. Infect Immun 1993, 61: 5106–5114.

Le Bouguénec C, Lalioui L, du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, Selvarangan R, Nowicki BJ, Germani Y, Andremont A, Gounon P, Garcia MI.Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. J Clin Microbiol, 2001 39: 1738–1745.

Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR, Sotman S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produceheat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet 1978, 1:1119-22.

Levine MM. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans and animals. Ciba Found Symp. 1981;80:142-60.

Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol Rev 1984,6: 31-51

Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, O'Brien AD. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of entero-pathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding na enteroadhesiveness factor. J Infect Dis 1985,152:550-9.

Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 1987, 155:377–389.

Lior, H. 1996. Classification of *Escherichia coli*, p. 31–72. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Lopes LM, Fabbricotti SH, Ferreira AJ, Kato MA, Michalski J, Scaletsky IC. Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. J Clin Microbiol. 2005, 43:1968-72.

López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, Tarr PI, Estrada-García T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2003, 9(1):127-31.

Magalhães M, Amorim RJ, Takeda Y, Tsukamoto T, Antas MG, Tateno S. Localized, diffuse, and aggregative-adhering *Escherichia coli* from infants with acute diarrhea and matchedcontrols. Mem Inst Oswuldo Cruz 1992, 87: 93-97.

Manirakiza A, Megne-Boudjeka P, Bobossi-Serengbe G, Bercion R, Le Faou A. Prevalence of shigellosis diarrhoea in a paediatrics population: hospital based survey in Bangui, Central African Republic. J Infect Dev Ctries. 2010, 4(10):655-7.

Maranhão HS, Medeiros MC, Scaletsky IC, Fagundes-Neto U, Morais MB. The epidemiological and clinical characteristics and nutritional development of infants with

acute diarrhoea, in north-eastern Brazil. Ann Trop Med Parasitol. 2008 Jun;102(4):357-65.

Marchand JB, Kaiser DA, Pollard TD, Higgs HN. Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. Nat. Cell Biol. 2001, 3:76–82.

Mathewson JJ, Jiang ZD, Zumla A, Chintu C, Luo N, Calamari SR, Genta RM, Steephen A, Schwartz P, DuPont HL. HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* in patients with human immunodefficiency virus-associated diarrhea. J. Infect. Dis 1995, 171:1636–1639.

McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayréde JP, Donnenberg MS, Hecht G. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. J. Clin. Invest. 2001, 107: 621–629.

Medeiros MI, Neme SN, da Silva P, Capuano DM, Errera MC, Fernandes SA, do Valle GR, de Avila FA. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001, 43(1): 21-4.

Melo AR, Lasunskaia EB, Almeida CM, Schriefer A, Kipnis TL, Dias da Silva W. Expression of the virulence factor, BfpA, by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for apoptosis signalling but not for NF-kappaB activation in host cells. Scand. J. Immunol 2005,61:511–519

Melton-Celsa AR, O'Brien AD. *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing E. coli Strains. ASM Press, Washington DC, USA, 1998 121–128.

Menard R, Sansonetti PJ, Parsot C. Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella* flexneri entry into epithelial cells. J. Bacteriol. 1993, 175:5899–5906.

Menard LP, Dubreuil JD. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. Crit Rev Microbiol 2002, 28: 43–60.

Merson MH, Sack RB, Islam S, Saklayen G, Huda N, Huq I, Zulich AW, Yolken RH, Kapikian AZ. Disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in Bangladeshi adults: clinical aspects and a controlled trial of tetracycline. J. Infect. Dis. 1980, 141:702–711.

MoezArdalan K, Zali MR, Dallal MM, Hemami MR, Salmanzadeh-Ahrabi S. Prevalence and pattern of antimicrobial resistance of *Shigella* species among patients with acute diarrhoea in Karaj, Tehran, Iran. J Health Popul Nutr 2003, 21: 96–102.

Mohamed JA, Huang DB, Jiang ZD, DuPont HL, Nataro JP, Belkind-Gerson J, Okhuysen PC. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. J Clin Microbiol. 2007, 45(1):121-6.

Mondal D, Haque R, Sack RB, Kirkpatrick BD, Petri WA, Jr. Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of preschool children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. Am J Trop Med Hyg 2009, 80: 824-826

Moreira, C. G., Carneiro, S. M., Nataro, J. P., Trabulsi, L. R. & Elias, W. P. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 2003, 226, 79–85.

Moreno AC, Filho AF, Gomes Tdo A, Ramos ST, Montemor LP, Tavares VC, Filho Ldos S, Irino K, Martinez MB. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010, 66(1): 50-7

Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Infect Dis. 2007, 7:92.

Moyo S J, Gro N, Matee M I, Kitundu J, Myrmel H, Mylvaganam H, Maselle S Y, Langeland N. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. Moyo et al. BMC Pediatrics 2011, 11:19.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller M, Yolken R. Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition, ASM Press, Washington, DC, 2007.

Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya MK, Krishnan T, Ganguly S, Rajendran K, Manna B, Ghosh M, Okamoto K, Takeda Y. Emerging trends in the etiology of enteric pathogens as evidenced from an active surveillance of hospitalized diarrhoeal patients in Kolkata, India. Gut Pathog. 2010, 2:4.

Nataro JP, Scaletsky ICA, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR. Plasmid-mediated factors confering diffuse and localized adherence of enteropathogenic Escherichiu coli. Infect Immun1985; 48: 378-383.

Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Pediatr. Infect. Dis. 1987 6: 829:831.

Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infect Immun. 1992, 60:2297-304.

Nataro JP, Yikang D, Yingkang D, Walker K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1994, 176(15):4691-9.

Nataro JP, Deng Y, Cookson S. Heterogeneity of enteroaggregative scherichia coli virulence demonstrated in volunteers.J Infect Dis 1995, 171: 465–468.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev 1998;11:142–201.

Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. Current Opinion in Gastroenterology, 2005, 21:4–8.

Navarro-Garcia F, Sears C, Eslava C, Cravioto A, Nataro JP. Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun 1999, 67: 2184–2192.

Nishi J, Sheikh J, Mizuguchi K, Luisi B, Burland V, Boutin A, Rose DJ, Blattner FR, Nataro JP. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATPbinding cassette transporter system. J Biol Chem 2003, 278: 45680–45689.

Nowicki B, Barrish JP, Korhonen T, Hull RA, Hull SI. Molecular cloning of the *Escherichia coli* O75X adhesin. Infect Immun 1987, 55: 3168–3173.

O'Brien AD, Thompson MR, Cantey JR, Formal SB. Production of a *Shigella* dysenteriae-like toxin by pathogenic *Escherichia coli*, abstr. B-103. In Abstracts of the 77th Annual Meeting of the American Society for Microbiology 1977, Washington.

O'Brien AD, LaVeck GD, Griffin DE, Thompson MR. Characterization of *Shigella* dysenteriae 1 (Shiga) toxin purified by anti-Shiga toxin affinity chromatography. Infect. Immun. 1980, 30:170–179.

O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol.Rev. 1987, 51:206–220.

Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F, Mispireta ML, Gil AI, Contreras C, Molina M, Amemiya I, Verastegui H, Hall ER, Cleary TG, Lanata CF. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from Periurban areas in Lima, Peru. Clin Infect Dis. 2009, 49(11):1694-702.

Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. Science. 2005, 307:727-31.

Ogawa M, Sadakawa C. *Shigella* and autophagy Review: Spotlight on Bacterial Pathogenesis. Landes Bioscience 2006, 2: 171-174.

Ogawa M, Handa Y, Ashida H, Suzuki M, Sasakawa C. The versatility of *Shigella* effectors. Nature Reviews Microbiology 2008, 6: 11-16.

Okeke IN, Lamikanra A, Czezulin J, Dubovsky F, Kaper JB, Nataro JP. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. J Infect Dis 2000, 181:252–260.

Okeke IN, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli*. Lancet Infect Dis. 2001, 1(5):304-13.

Okhuysen PC, Dupont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance. The Journal of Infectious Diseases 2010, 202(4):503–50.

Olsvik, O., and N. A. Strockbine. 1993. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*, p. 271–276. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Mayo Foundation, Rochester, N.Y.

Orlandi PP, Magalhães GV, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Silva LH. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil), Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2006, 39: 507-517.

Parsot C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. FEMS Microbiol Lett. 2005, 252(1):11-8.

Peiffer I, Servin AL, Bernet-Camard MF. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. Infect. Immun. 1998, 66: 4036–4042.

Peng J, Yang J, Jin Q. The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. Infect Genet Evol. 2009 9(1):147-52.

Pham TQ, Goluszko P, Popov V, Nowicki S, Nowicki BJ. Molecular cloning and characterization of Dr-II, a nonfimbrial adhesin- I-like adhesin isolated from gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* that binds to decayaccelerating factor. Infect Immun 1997, 65: 4309–4318.

Qadri F, Das SK, Faruque AS, Fuchs GJ, Albert MJ, Sack RB, Svennerholm AM. Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2000, 38:27–31.

Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev 2005, 18: 465-483.

Rahaman MM. A strategy for control of shigellosis (dysentery) in Teknaf- a rural Bangladesh village. Prog WAat Tech 1979: 11: 303-8. Rao, M. CToxins which activate guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins. Ciba Found. Symp. 1985, 112:74–93.

Rajendran P, Ajjampur SS, Chidambaram D, Chandrabose G, Thangaraj B, Sarkar R, Samuel P, Rajan DP, Kang G. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010, 68(2):117-22.

Regua-Mangia AH, Gomes TA, Vieira MA, Andrade JR, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. J Infect. 2004, 48:161-7.

Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, Selander RK, Whittam TS. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. Nature 2000, 406:64–67.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichiacoli serotype. N. Engl. J. Med. 1983, 308:681–685.

Robins-Browne R M, Bordun A, Tauschek M, Bennett-Wood TM, Russell J, Oppedisano F, Lister NA, Bettelheim KA, Farley CK, Sinclair MI, Hellard ME.

Escherichia coli and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. Emerg. Infect. Dis. 2004, 101:1797–1805.

Rodrigues J, Scaletsky ICA, Campos LC, Gomes TAT, Whittan ST, Trabulsi LR. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. Infect Immun 1996, 64:2680-6.

Rodrigues J, Acosta V.C, Candeias J.M.G, Souza L.O, Filho F.J.C. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu, São Paulo State, Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2002, 35: 1311-1318.

Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. Cell 1999, 97:221–231.

Rosa AC, Mariano AT, Pereira AM, Tibana A, Gomes TA, Andrade JR. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. J Med Microbiol. 1998, 47(9):781-90.

Sallee NA, Rivera GM, Dueber JE, Vasilescu D, Mullins RD, Mayer BJ, Lim WA. The pathogen protein Espf(U) hijacks actin polymerization using mimicry and multivalency. Nature 2008, 454: 1005–1008.

Sal-Man N, Biemans-Oldehinkel E, Finlay BB. Structural microengineers: pathogenic *Escherichia coli* redesigns the actin cytoskeleton in host cells. Structure 2009, 17(1):15-9.

Samie A, Obi CL, Dillingham R, Pinkerton RC, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children Am J Trop Med Hyg. 2007, 77(1):142-50

Sansonetti, P. J. 1992. Molecular and cellular biology of *Shigella* flexneri invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 180:1–19.

Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, Erdene S, Nataro JP, Sheikh J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Miyata K, Kawano Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among E. coli strains causing diarrhea in Mongolian children. J Clin Microbiol 2004, 42(1):133-9.

Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect Immun 1984, 45: 534-6.

Scaletsky IC, Pelayo JS, Giraldi R, Rodrigues J, Pedroso MZ, Trabulsi LR. EPEC adherence to HEp-2 cells. Rev. Microbiol. 1996, 27:58-62.

Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Silva SO, Morais MB, Fagundes-Neto U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. Emerg. Infect. Dis 2002a, 8:855–858.

Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Carvalho RL, Nunes CR, Maranhão HS, Morais MB, Fagundes-Neto U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. J Clin Microbiol. 2002b, 40(2):645-8.

Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Aranda KR, Morais MB, Fagundes-Neto U. Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2002c, 40(4):1254-8.

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

Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 1995, 33(3):701-5.

Schmidt MA. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. Cell Microbiol. 2010, 12(11):1544-52.

Schroeder GN, Hilbi H. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. Clin Microbiol Rev. 2008, 21(1): 134–156.

Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, Echeverria P. Detection of *Shigella*e and Enteroinvasive *Escherichia coli* by Amplification of the Invasion Plasmid Antigen H DNA Sequence in Patients with Dysentery. The Journal of Infectious Diseases 1993,167:458-61.

Shariff M, Bhan MK, Knutton S, Das BK, Saini S, Kumar R. Evaluation of the Fluorescence Actin Staining Test for Detection of Enteropathogenic *Escherichia coli*. Journal of clinical microbiology1993, 386-389.

Sheikh J, Czeczulin JR, Harrington S, Hicks S, Henderson IR, Le Bouguénec C, Gounon P, Phillips A, Nataro JP. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Invest 2002, 110: 1329–1337.

Snyder JD, Wells JG, Yashuk J, Puhr N, Blake PA. Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984, 33:281–284.

Sonoda C, Tagami A, Nagatomo D, Yamada S, Fuchiwaki R, Haruyama M, Nakamura Y, Kawano K, Okada M, Shioyama Y, Iryoda K, Wakamatu H, Hidaka Y. An enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak at a nursery school in Miyazaki, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 2008, 61:92–93.

Spano LC, Sadovsky AD, Segui PN, Saick KW, Kitagawa SM, Pereira FE, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with and without acute diarrhoea. Journal of Clinical Microbiolog 2008, 57: 359-363, 2008.

Spencer J, Smith HR, Chart H. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from outbreaks of diarrhoeal disease in England. Epidemiol Infect 1999, 123: 413–421.

Stricklett PK, Hughes AK, Ergonul Z, Kohan DE. Molecular Basis for Up-Regulation by Inflammatory Cytokines of Shiga Toxin 1 Cytotoxicity and Globotriaosylceramide Expression. Oxford Journals Medicine Journal of Infectious Diseases 2002, 186: 976-982.

Sui BQ, Dutta PR, Nataro JP. Intracellular expression of the plasmid-encoded toxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun 2003, 71:5364–5370.

Suzart S, Gomes TAT, Guth BEC. Characterization of serotypes and outer membrane protein profiles in enteroaggregative *Escherichia coli* strains. Microbiol Immunol 1999, 43: 201–205.

Suzart S, Guth BEC, Pedroso MZ, Okafor UM, Gomes TAT. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and withoutthe EAEC DNA probe sequence. FEMS Microbiol Lett 2001, 201:163–168.

Suzuki T, Miki H, Takenawa T, Sasakawa C. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella* flexneri. EMBO J. 1998, 17:2767-76.

Taylor J, Powell BW, Wright J. Infantile diarrhoea and vomiting: a clinical and bacteriological investigation. Br Med J 1949, 2:117-41

Taylor DN, Echeverria P, Sethabutr O, Pitarangsi C, Leksomboon U, Blacklow NR, Rowe B, Gross R, Cross J. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. J Clin Microbiol 1988, 26: 1362-6.

Tenover FC. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. Clin Microbiol Revs 1988, 1:82-101.

Toledo MR, Alvariza Mdo C, Murahovschi J, Ramos SR, Trabulsi LR. Enteropathogenic *Escherichia coli*serotypes and endemic diarrhea in infants. Infect Immun 1983, 39:586-9

Torres A G., Zhou X, Kaper JB. Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. INFECTION AND IMMUNITY, Jan. 2005, p. 18–29.

Trabulsi LR, Toledo MRF, Ceballos BSO, Candeias. Epidemiology of diarrhoeal diseases in South America. Elsevier Science Publisher 1985, 12: 121-125.

Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.Emerg. Infect. Dis 2002, 8:508–513.

Trabulsi, L. R.; Alterthun, F. *Microbiologia*. 4ª ed., Atheneu, São Paulo, 2005.

Uber AP, Trabulsi LR, Irino K, Beutin L, Ghilardi AC, Gomes TA, Liberatore AM, de Castro AF, Elias WP. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. FEMS Microbiol Lett 2006, 256: 251–257.

Usein CR, Tatu-Chitoiu D, Ciontea S, Condei M, Damian M. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in Romanian children younger than 5 years of age. Jpn J Infect Dis. 2009, 62(4):289-93.

Yoshida S, Handa Y, Suzuki T, Ogawa M, Suzuki M, Tamai A, Abe A, Katayama E, Sasakawa C. Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading. Science. 2006 314:985-9.

Vallance BA, Finlay BB. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 2000;97:8799–8806.

Vasselon T, Mounier J, Hellio R, Sansonetti PJ. Movement along actin filaments of the perijunctional area and de novo polymerization of cellular actin are required for *Shigella* flexneri colonization of epithelial Caco-2 cell monolayers. Infect. Immun. 1992, 60:1031–1040.

Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP, Maneval D, Elsayed A, Levine MM. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis 1988, 158:70-9.

Vidotto MC, Kobayashi RK, Dias AM. Unidentified serogroups of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with diarrhoea in infants in Londrina, Parana, Brazil. J. Med. Microbiol 2000,49:823–826.

Vieira MA, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa AC, Dias AM, Ramos SR, Frankel G, Gomes TA. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic E. coli (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. J. Infect. Dis 2001, 183:762–772.

Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Möllby R, Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. J Med Microbiol. 2009, 58:630-7.

Vu Nguyen T, Le Van P, Le Huy C, Nguyen Gia K, Weintraub A. Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam. Int J Infect Dis 2006, 10: 298–308.

Vu Nguyen RN, Taylor L, Tauschek M, Robins-Browne RM. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. Emerg. Infect. Dis. 2006, 12:597–603.

Walker CL, Black RE. Diarrhoea morbidity and mortality in older children, adolescents, and adults. Epidemiol Infect. 2010, 138(9):1215-26.

Wakimoto, J. Nishi, J. Sheikh, et al., “Quantitative biofilm assay using a microtiter late to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*,” American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 71, no. 5, pp. 687–690, 2004

Waters V, Ford-Jones EL, Petric M, Fearon M, Corey P, Moineddein R. Etiology of community-acquired pediatric viral diarrhea: a prospective longitudinal study in

hospitals, emergency departments, pediatric practices and child care centers during the winter rotavirus outbreak, 1997 to 1998. The Pediatric Rotavirus Epidemiology Study for Immunization Study Group. Pediatr Infect Dis J. 2000, 19 (9): 843-8.

WHO-UNICEF. Global water supply and sanitation assessment: 2000 report. WHO/UNICEF Joint monitoring programme for water supply and sanitation, Geneva/New York. 2002.

WHO. The global burden of disease: 2004 update. Geneva: World Health Organization. 2008.

WHO. World heath statistics. World Health Organization. 2010.

Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman EW, Procop G, Schreckenberger P, Woods G.. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

Wilson A, Evans J, Chart H, Cheasty T, Wheeler JG, Tompkins D, Smith HR. Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England. Eur J Epidemiol 2002, 17: 1125–1130.

Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1997, 10(4):569-84.

World Health Organization. Programme for control of diarrheal diseases (CDD/83.3 Rev1). In Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. Geneva WHO 1987, 27.

World Health Organization. Persistent diarrhea in children in developing countries. Memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 1988, 66:709-17.

Zhang L, Foxman B, Tallman P, Cladera E, Le Bouguenec C & Marrs CF. Distribution of drb genes coding for Dr binding adhesins among uropathogenic and fecal *Escherichia coli* isolates and identification of new subtypes. Infect Immun 1997, 65: 2011–2018.

Zychlinsky A, Kenny B, Ménard R, Prévost MC, Holland IB, Sansonetti PJ. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella* flexneri. Mol. Microbiol. 1994, 11:619–627.

10 ANEXOS

10 ANEXOS

10.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 21 de dezembro de 2006

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Profª. Sônia Maria de Souza Kitagawa
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **"Enteropatógenos bacterianos em diarréia aguda de crianças quilombolas e da periferia urbana de São Mateus, ES."**

Senhora Pesquisadora,

Informamos à Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa, **Nº Registro no CEP-129/06**, intitulado: **"Enteropatógenos bacterianos em diarréia aguda de crianças quilombolas e da periferia urbana de São Mateus, ES"**, e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 20 de dezembro de 2006,

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,

Prof Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Biomédico / UFES

Comitê de Etica em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde
Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.
Telefax: (27) 3335 7504

10. 2 FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

UFES CEUNES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA **N°** [ ]

Criança:

.....

Data da coleta:...../...../.200..... Horário da coleta: .....

Horário da inoculação:..... Horário da refrigeração: ..... Responsável pela coleta.....

Local: Bairro:.....UBS:.....

Fezes diarréicas: ( ) não ( ) sim

Caso sim, quais as características? : ( )líquidas ( )sanguinolentas ( )com catarro ( ) gordurosa ( ) forte cheiro de podre ( ) amarela ( ) marrom ( ) esverdeada ( ) negras

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
DOCETE OMNES GENTES

10.3 FICHA DE DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS

ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE CAUSAS E CONDICIONANTES DAS GASTROENTERITES EM CRIANÇAS NEGRAS E QUILOMBOLAS DE SÃO MATEUS e C. da BARRA, ES.

Criança:.....

Bairro:.....Nº:..... Complemento: .....

Rua:.....

Referência:.....

Aplicador:.....Data de aplicação: ...../...../..... Coleta ...../...../.....

Inspeção

1) Tipo de Construção: ( )alvenaria ( )taipa ( )pau-a-pique ( )mista ( ) outro.....

2) Piso da casa? ( ) taco ( )cerâmica ( )cimento queimado ( )terra batida( ).....

3) Impressão visual do piso: ( )bom estado ( )mal estado

4) Impressão da condição de higiene da casa:

( )bom estado ( )mal estado ( )presença de insetos ( )moscas ( ) baratas ( )presença de roedores ( ) presença de lixo espalhado ( ) .....

5) Proximidade da residência com: ( ) rio ( )água parada ( )esgoto aberto ( )não está próximo à água ( ) não ( )outro .....**5.1) Caso positivo, quantos metros?** .....

6) Como é a rua: ( )pavimentada ( )chão ( )outro.....

7) Possui geladeira? ( )sim ( )não

8) No banheiro tem sabão? ( )sim ( )não ( ) não permitiu o acesso

9) Aspectos visuais da higiene do banheiro?: ( )sujo ( )limpo ( ) não permitiu o acesso

10) Possui quintal? ( ) sim ( ) não 10.1) Como é o chão do quintal? ( )arenoso ( )barro ( )grama ( )cimentado ( )sem quintal ( ).....

11) Aspectos visuais da higiene da cozinha: ( ) sujo( ) limpo

FORMULÁRIO

Residência

12) Quantidade e localização do banheiro: ( ) interno ( ) com acesso à cozinha ( ) externo ( ) distante da residência

13) Composição do banheiro? ( ) vaso sanitário ( )buraco no chão ( )pia ( )água corrente

14) Quantos cômodos tem a casa? .....

15) Para onde vai o esgoto? ( )fossa ( )céu aberto ( )rio ( )rede coletora ( )pocilga ( ).....

16) Destino do lixo: ( ) coleta pública ( ) vala ( ) enterrado ( ) queimado ( ) a céu aberto

17) Origem da água de beber: ( )SAAE ( )poço ( )nascente ( )rio ( )mineral ( )cisterna ( ).....

18) Água de beber: ( )filtrada ( )fervida ( ) comprada ( ) não tratada ( ).....

19) Origem da água de cozinhar: ( )SAAE ( )poço ( )nascente ( )rio ( ) .....

20) Origem da água de limpeza da casa: ( )SAAE ( )poço ( )nascente ( )rio ( ).....

21) Origem da água para lavar roupa: ( )SAAE ( )poço ( )nascente ( )rio ( ).....

22)Há animais na casa? ( )não possui ( )cão ( )gato ( )pássaros, quais.....
.....Outros. .....

Arranjo familiar

23) Quantas pessoas moram na casa? .....

24) Quantas crianças abaixo dos cinco anos de idade vivem na residência? .....crianças

25) Discriminar o sexo e a idade das crianças com menos de 5 anos em ordem crescente:

1- M F ..... anos; **2-** M F ..... anos; **3-** M F ..... anos; **4-** M F ..... anos; **5-** M F ..... anos

26) Grau de escolaridade dos pais? 1- pai ..... **2-** mãe .....

27) Quantas pessoas da família trabalham com remuneração? .....pessoas

28) Das pessoas que trabalham, quantas <u>não</u> tem carteira assinada ou contrato formal de trabalho? .....pessoas

29) Das que trabalham como diaristas, qual o valor aproximado da diária de trabalho? R$.....

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

30) Alguma criança contribui na geração de renda ou na alimentação da família? ( )não ( )sim **Quantas?**.....
31) Quantas crianças freqüentam creche? .....crianças
32) Quantos salários mínimos a família recebe? .....salários mínimos

Criança

33)Idade da criança com diarréia: .....anos.....meses **data de nascimento:**...../...../.....
34) A criança freqüenta creche? ( )não ( )sim
35) A criança está com diarréia neste momento? ( )não ( )sim
36) Há quantos dias começou a diarréia? ..... dias
37) Qual foi a duração em dias da diarréia? ..... dias
38) Qual o número máximo de evacuações que a criança chegou a ter num único dia? .....
39) A criança apresentou vômito? ( )não ( )sim
40) A criança vomitou por quantos dias?..... dias.
41) Aspecto das fezes diarréicas: ( )líquidas ( )sanguinolentas ( )com catarro ( )gordurosa ( )forte cheiro de podre ( ) .....
42) Qual a coloração das fezes diarréicas: ( ) amarela ( ) marrom ( ) esverdeada ( ) negras
43) A criança reclamou de dor de barriga ou dor abdominal? ( )não ( )sim
44) Apresentou outro problema de saúde na semana anterior ou durante a diarréia? ( )não ( )sim
45) Em caso de febre, qual foi a temperatura máxima registrada: .....°C ( ) não apresentou
46)Apresentou manifestações respiratórias: ( )coriza ( )espirro ( )catarro ( ) tosse ( ) outras ..... ( ) não
47) Sinais de comprometimento do SNC: ( )perda do equilíbrio ( )perda da memória ( )dificuldade de caminhar ( )dificuldade para falar ( )dificuldade para comer ( )dificuldade para beber ( )excesso de baba ( )desmaio ( )convulsão ( )enrijecimento ( )outros..... ( ) não
48) Tratamento caseiro: ( )tomou soro caseiro ( ) medicamento ( ) chá ( ) água em quantidade aumentada ( ) não houve ( ) .....
49) Houve consulta médica durante o período da diarréia: não( ) sim( ) **49.1) Quais locais?** ( )UBS ( )particular ( )PA ( )Hospital ( )outro.....
50) Houve tratamento após a consulta médica? ( ) soro na veia ( )bebeu soro na unidade ( ) tomou soro caseiro ( ) medicamento ( ) chá ( ) água em quantidade aumentada ( ) não houve ( ).....
51) Houve Internação? ( )não ( )sim **51.1)Onde?**..... **51.2) Tempo de internação**.....dias
52) Ficou internado na UTI: ( ) não ( ) sim
53) Foi submetido a cirurgia: ( ) não ( ) sim
54) Tratamento durante a internação: ( ) soro na veia ( ) medicamento ( ) água em quantidade aumentada ( ) .....
55) A criança teve diarréia nos últimos meses? ( ) não ( ) sim **55.1) Quando?** .....
56) Já foi internada? ( )não( )sim **56.1) Por quê?** .....**56.2) Alguma vez por diarréia?** ( )não ( )sim
57) Houve algum problema relacionado à lombriga ou outro verme? ( ) não ( ) sim **57.1)** Qual? .... **57.2) Com algum processo de desobstrução intestinal?** ( ) não ( ) sim **57.3) Intervenção cirúrgica?** ( )não ( ) sim
58) Possui cartão de vacinação? ( )não ( ) sim
59) Tomou todas as vacinas obrigatórias para sua idade? ( )não ( ) sim **59.1) Tomou alguma vacina não obrigatória?** ( )não ( )sim **59.2) Qual?** ....
60) Foi vacinado para *Rotavirus*? ( )não ( )sim em _____/_____/_____ e em _____/_____/_____
61) Tomou remédio de "verme" alguma vez?: ( )não ( )sim **61.1) Há quanto tempo?** .....
61.2) Qual remédio a criança tomou?.....

Outro acometido

62) Há outro morador da casa com diarréia? ( )não ( )sim **62.1) Quantos?** .....
1- idade: ..... anos **2- idade:** ..... anos
63) Alguém teve diarréia nos últimos 30 dias? ( )não ( )sim ( )adulto ou ( )criança
64) Há alguém com diarréia crônica ou reincidente na família? ( )não ( )sim ( )adulto ou ( )criança

Atitudes de risco

65) A criança mergulha em: ( ) rio ( )lago ( ) córrego **65.1) Qual?** ..... ( ) não
66) Faz ou fez "cocô" no chão ultimamente: ( ) não ( ) sim
67) (Para crianças de até 6 meses**) Há aleitamento materno exclusivo?** ( )sim ( )não ( ) não houve aleitamento materno **67.1) Quanto tempo durou?**..... **67.2) Caso não seja exclusivo neste momento, quais alimentos complementam a dieta:**.....
.....
68) (Para crianças entre 6 meses e 2 anos**) Houve aleitamento materno exclusivo?** ( )sim ( )não ( ) não houve aleitamento materno **68.1) Quanto tempo durou?** .....**68.2)Caso não seja exclusivo neste**

momento, quais alimentos complementam a dieta: .....
.....

69) A criança toma mamadeira? ( )não ( )sim **69.1) Qual leite?** ( )leite pasteurizado ( )esterilizado ( )cru fresco ( ) cru, fervido em casa ( )em pó ( )integral ( )semi-desnatado ( )desnatado ( )outro.....

70) Quando sobra leite na mamadeira?: ( )descarta ( ) reaproveita para a criança ( )reaproveita para outros fins

71) A criança usa chupeta: ( )não ( )sim **71.1) Quando a chupeta cai no chão, qual é o procedimento?** ( )lava com água e sabão ( ) só com água ( )ferve ( )não lava e nem ferve

Evolução das características clínicas para a desidratação:

72) Freqüência urinária diária (mínima): ( ) normal ( ) aumentada ( ) diminuída **72.1) Cor da urina:** ( ) normal ( ) escura ( ) clara

73) Retorno cutâneo: .....segundos

74) Presença de lágrimas: ( )não ( )sim

75) Presença de saliva: ( )não ( )sim

76) Olhos opacos: ( )não ( )sim

77) Moleira funda: ( )não ( )sim

78) Freqüência cardíaca: .....bpm

79) Frequência respiratória: .....rpm

80) Manchas claras na pele: ( )não ( )sim

81) Manchas claras nas unhas: ( )não ( )sim

Obs. Reproduzir a curva de ganho de Peso (gráfico em anexo) e tabela de registro de vacinação.

82) O cartão está preenchido correta e completamente? ( ) não ( ) sim

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
DOCETE OMNES GENTES

10.4 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

10.4.1 Meios para isolamento e identificação das bactérias

10.4.1.1 Cary-Blair *(Bencton Dickinson)*

ÁgarCary-Blair	40 g
Água destilada	1000 ml

10.4.1.2 Ágar MacConkey *(Merck e Difco)*

Ágar MacConkey	40 g
Água destilada	1000 ml

10.4.1.3 Ágar SS *(Merck e Vetec)*

Ágar SS	40 g
Água destilada	1000 ml

10.4.1.4 Fenilalanina *(Bencton Dickinson)*

Ágar Fenilalanina	40 g
Água destilada	1000 ml

10.4.1.5 TSI *(Merck)*

Ágar TSI	40 g
Água destilada	1000 ml

10.4.1.6 Citrato (*Merck*)

Ágar Citrato	40 g
Água destilada	1000 ml

10.4.1.7 Ágar nutriente *(Vetec)*

Ágar Nutriente	40 g
Água destilada	1000 ml

10.4.1.8 BHI (*Merck*)

Ágar BHI	40 g
Água destilada	1000 ml

10.4.1.9 MiLi

Extrato de levedura	0,6 g
Peptona	2,0 g
Triptona	2,0 g
L-lisina	2,0 g
Glicose	0,2 g
Ágar-ágar	0,4 g
Púrpura de bromocresol	0,004 g
Água destilada	200 ml

10.4.1.10 Caldo peptonado

NaCl	1 g
Peptona	4 g
Água destilada	200 ml

10.4.1.11 Caldo VMVP

Peptona	5 g
K_2HPO_4	5 g
Glicose	5 g
Água destilada	1000 ml

10.4.2 Soluções

10.4.2.1 Reativo de Kovacs

Álcool isoamílico	30 ml
p-dimetilaminobenzaldeído	2 g
HCl concentrado	10 ml

10.4.2.2 $FeCl_3$ 10%

$FeCl_3$	10 g
Água destilada	100 ml

10.4.2.3 Vermelho de Metila

Vermelho de metila	0,1 g
Álcool 95%	300 ml
Água destilada	500ml

10.4.3 Reagentes e soluções utilizados no ensaio de aderência em células HEp-2

10.4.3.1 DMEM Hepes 10% SFB

DMEM em pó para 1Litro (*Cultilab*)

Hepes (*Sigma*)	3,6g
$NaHCO_3$ (*Merck*)	0,2g
SFB (*Cultilab*)	10%
Água deionizada	q.s.p

pH 7,4

10.4.3.2 BSS livre de cálcio e magnésio

Preparo de 1L de solução

Cloreto de sódio	8g
Cloreto de potássio	0,4g
Fosfato de sódio dibásico	0,39g
Sulfato de sódio	0,1g
Fosfato de potássio	0,15g
Glicose	1,1g
Vermelho de fenol (*Merck*)	2,5ml
Água deionizada	q.s.p

pH 7,2

10.4.4 Reagentes e soluções utilizados nos ensaios de PCR

10.4.4.1 TBE 10X

Tris-HCl (*Invitrogen*)	1M
Ácido bórico (*Chemco*)	1M
EDTA (*Reagen*)	0,02M

pH final = 8,4

10.4.4.2 Gel agarose 2%

Agarose (BioAgency)	2%
TBE 1X	q.s.p

10.4.4.3 Tampão de arrasto

Azul de bromofenol (*Vetec*)	0,05%
Sacarose (*Invitrogen*)	40%
EDTA (*Reagen*)	0,1M
Lauril sulfato de sódio (*Sigma*)	0,5%

pH final = 8,0

10.4.5 Reagentes e soluções utilizados nos ensaios de hibridização

10.4.5.1 Solução SSC 1X

NaCl	0,15M
Citrato de sódio (*Merck*)	0,015M

10.4.5.2 Solução de Denhardt 100X

Albumina de soro bovino	2% (p/v)
Ficoll	2% (p/v)
Polivinilpirrolidona (PVP)	2% (p/v)

10 5 RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS NO ESTUDO

Genes detectados (PCR e Hibridização de colônia) e padrão de aderência em célula HEp-2 encontrados nos grupos diarréia e controle analisados.

Padrão de aderência/ genes pesquisados	**Grupo de amostras**		**Total n=382**
	Diarréia n=97	**Controle n=285**	
AA	49,5% (48)	42,1% (120)	44% (168)
CVD432	23,7% (23)	20% (57)	20,9% (80)
pAA	15,5% (15)	10,9% (31)	12% (46)
AD	25,8% (25)	15,4% (44)	18,1% (69)
afaBC	15,5% (15)	8,4% (24)	10,2% (39)
eae (*bfpA*- e *stx*-)	13,4% (13)	13%(37)	13,1% (50)
AL	1% (1)	-	0,3% (1)
eae e *bfpA*	1% (1)	0,,7% (2)	0,8% (3)
lt	6,2% (6)	1% (3)	2,3% (9)
st	2,1 % (2)	(0)	0,5% (2)
ipaH	1% (1)	0,3% (1)	0,5% (2)