UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIENCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

KEYLA FONSECA DA CUNHA

"DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS DE *Escherichia coli* POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS EM INDIVÍDUOS DE TODAS AS IDADES ATENDIDOS NAS UNIDADES DE SAÚDE DE VITÓRIA-ES"

VITÓRIA

2013

KEYLA FONSECA DA CUNHA

“DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS DE *Escherichia coli* POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS EM INDIVÍDUOS DE TODAS AS IDADES ATENDIDOS NAS UNIDADES DE SAÚDE DE VITÓRIA-ES”

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.

VITÓRIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,

Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Cunha, keyla Fonseca da, 1986-

C972d Detecção e caracterização de patotipos diarreiogênicos de Escherichia coli por métodos fenotípicos e genotípicos em indivíduos de todas as idades atendidos nas unidades de saúde de Vitória-ES / Keyla Fonseca da Cunha. – 2013.

116 f. : il.

Orientadora: Liliana Cruz Spano.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Escherichia coli. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Gastroenterite. I. Rangel, Leticia Batista Azevedo. II. Greco, Sandro José. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU:61

À minha mãe, Maria da Penha (in memorian) pela educação e por despertar em mim a busca pelo conhecimento.

À minha irmã Lusia por acreditar no meu sucesso e pelo apoio em todas as decisões.

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda KEYLA FONSECA DA CUNHA apresentou a dissertação intitulada **"DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS DE *Escherichia coli*, POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS, EM INDIVÍDUOS ATENDIDOS NAS UNIDADES DE SAÚDE DE VITÓRIA-ES"** em sessão pública, no dia 15 de agosto de 2013, 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 decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica KEYLA FONSECA DA CUNHA obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 15 de agosto de 2013

Sônia Maria de Souza Kitagawa
Profa. Dra. Sônia Maria de Souza Kitagawa
(Membro Externo)

Profa. Dra. Bluma Fux
(Membro Interno)

Profa. Dra. Liliana Cruz Spano
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, a Ele toda honra, glória, louvor e gratidão.

À minha orientadora, Drª. Liliana Cruz Spano, pela amizade, paciência e dedicação. Obrigada pela orientação desde que comecei na iniciação científica, em 2007.

À Drª. Isabel Cristina Affonso Scaletsky pela importante colaboração nos experimentos de hibridização de colônia e cultura de células.

À Drª. Sônia Maria de Souza Kitagawa por aceitar participar da banca examinadora.

À Drª. Dra. Kenia Valeria dos Santos por aceitar participar da banca examinadora.

À Drª. Dra. Blima Fux por aceitar participar da banca examinadora.

Ao Dr. Moisés Palaci por aceitar participar da banca examinadora.

A todos os amigos e amigas, especialmente às minhas melhores amigas Bruna, Aline, Monique, Fernanda, Helena, Viviane, Kéury e ao meu melhor amigo Carlos Eduardo, que mesmo sem entender exatamente o que é um "patotipo diarreiogênico de *Escherichia coli*", estiveram ao meu lado e acreditaram no meu sucesso. "*Um amigo fiel é uma poderosa proteção: quem o achou, descobriu um tesouro*." (Eclo 6, 14)

À amiga Laura, companheira nos experimentos e grande conselheira. Obrigada por caminhar ao meu lado durante esta jornada.

Às amigas do LabGIn, Mariane, Marina e Yohanna, pela amizade e por todo auxílio nos experimentos.

Às funcionárias do LabGIn: Heloisa, Lia, Érica e Idenir por todo auxílio na realização dos trabalhos e pelas horas de distração, almoços e lanches compartilhados.

À mestre Simone e às amigas dos laboratórios vizinhos, Marcela, Izabela e Samira por contribuírem para um ambiente de trabalho agradável.

Ao mestre Ronaldo B. Júnior, pelo auxílio com o cultivo de células, sempre com muita dedicação.

À Dra. Rita, à Dra. Conceição e à toda equipe do Laboratório Central de Microbiologia da SEMUS que contribuíram para que esse trabalho acontecesse, fornecendo para nós as amostras.

A todos os amigos do Grupo de Oração Caminho da Esperança e do Grupo de Oração Trindade Santa, pelas poderosas orações e pelos sábios conselhos.

A todos do NDI que contribuíram para que esse trabalho acontecesse.

Aos professores do Mestrado, especialmente ao professor Dr. Moisés Palaci, por toda dedicação, ética e sabedoria.

Às professoras do departamento de microbiologia, Drª.Ana Paula Nunes, Kênia Valéria, Mariceli Araújo, e ao Professor Ricardo, pela contribuição científica e pela dedicação.

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

RESUMO

A diarreia é a segunda causa de mortalidade em <5 anos e é responsável pela diminuição da produtividade na população economicamente ativa. Dentre os agentes infecciosos envolvidos, seis patotipos diarreiogênicos de *Escherichia coli* (DEC) merecem destaque: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroemorrágica ou produtora de toxina de Shiga (EHEC/STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). O objetivo deste estudo foi determinar a frequência dos patotipos de DEC e caracterizar fenotípica e genotipicamente EAEC, DAEC, aEPEC e *E. coli chain-like adhesion* (CLA) isolados de fezes indivíduos de todas as idades atendidos nas Unidades de Saúde do município de Vitória, ES, entre janeiro de 2008 e junho de 2011. Os isolados de *E. coli* foram submetidos à: (i) PCR para detecção dos genes *eae*, *bfpA*, *aat*, *lt*, *st*, *ipaH*, *stx1* e *stx2*; (ii) hibridização de colônia com as sondas *eae*, *aat* e *daaC*; (iii) adesão em cultura de células HEp-2 para evidenciar padrão de aderência agregativa (AA), difusa (DA) e *chain-like adhesion* (CLA). PCR para detecção de genes de virulência foi realizado em isolados de EAEC, CLA, DAEC e aEPEC. Isolados de EAEC e CLA, foram submetidos a testes de formação de biofilme e de película. Foram obtidos 328 espécimes fecais e *E. coli* foi isolada de 85,7%. Os seguintes patotipos foram identificados: EAEC (18,3%), DAEC (11%), aEPEC (2,6%), ETEC (0,7%). CLA foi identificada em 4,9% e EIEC, tEPEC e STEC não foram detectados. Dos 60 isolados de EAEC (AA) (25% aat+ por PCR e 35% por hibridização), fímbrias de aderência agregativa foram evidenciadas em baixa frequência (*aggA*- 1,7%, *aafA*- 0%, *agg3A*- 11,7%, *hdA*- 8,3%). EAEC típica correspondeu a 31,7% dos isolados de EAEC (*aggR*+), e foram significantes nestas a formação de biofilme, escore 3+ de produção de película e presença dos genes *aat*, *agg3A*, *hdA*, *aap*, *sat*, *pet*, *set1A* e *iucA*. Todos os isolados CLA apresentaram o gene *pet*, 87,5%, foram *aggR*-, formaram película e nenhum produziu biofilme. Dentre dos 42 isolados de DAEC (DA), a sonda *daaC* detectou 52,4%. PCR evidenciou adesinas afa/Dr (*daaD* e *afa*) em 59,5% e adesina AIDA-I não foi encontrada, sugerindo que outras adesinas estejam envolvidas na adesão da DAEC. Isolados de DAEC afa/Dr + foram estatisticamente mais isolados de <5 anos. Em aEPEC, os genes da ilha de patogenicidade OI-122 pesquisados, *nleE*, *efa1*/*lifA* e *paa* foram evidenciados em 30% dos isolados, todos provenientes de <5 anos. Características de virulência de tEAEC e DAEC Afa/Dr sugerem que sejam subpopulações relacionadas com diarreia. CLA não parece ser variante de EAEC.

Palavras-chave: *Escherichia. coli*, Adesão em cultura de células, Reação em cadeia pela polimerase, Hibridização de colônia, genes de virulência.

ABSTRACT

Diarrhea is the second leading cause of mortality in <5 years and is responsible for decreased productivity in the economically active population. Among the infectious agents involved six diarrheagenics pathotypes of *Escherichia coli* (DEC) are worth mentioning: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enterohemorragic *E. coli* or Shiga toxin-producing (EHEC/STEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and diffuselly adherent *E. coli* (DAEC). The aim of this study was to determine the frequency of DEC and to characterize phenotypic and genotypically EAEC, DAEC, aEPEC and chain-like adhesion *E. coli* (CLA) isolated from feces of all ages individuals treated at health units in the city of Vitória, between January 2008 and June 2011. *E. coli* were subjected to: (i) PCR for detection of *eaeA*, *bfpA*, *aat*, *lt*, *st*, *ipaH*, *stx1* and *stx2* genes; (ii) colony hybridization with *eae*, *aat* and *daac* probes; (iii) HEp-2 cells culture to show aggregative adherence (AA), diffuse (DA) and chain-like adhesion (CLA). PCR for detection of virulence genes was carried out in EAEC, CLA, DAEC and aEPEC. CLA and EAEC isolates were tested for biofilm formation and clump test. Fecal specimens (n=328) were obtained and *E. coli* was isolated from 85.7%. The following pathotypes were identified: EAEC (18.3%), DAEC (11%), aEPEC (2.6%), ETEC (0.7%). CLA was identified in 4.9% and EIEC, STEC and tEPEC were not detected. Out of the 60 isolates of EAEC (AA) (25% aat+ by PCR and 35% by hybridization) the aggregative adherence fimbriae were observed at low frequency (*aggA*-1.7%, *aafA*-0%, *agg3A*-11.7%, *hda*-8.3%). Typical EAEC were 31.7% of the EAEC isolates (aggR+), and among these, biofilm formation, score 3+ in clump test and the presence of *aat*, *agg3A*, *hda*, *aap*, *sat*, *pet*, *iucA* and *set1A* were significant. CLA isolates (87.5%) possessed the *pet* gene, all were *aggR*- and were clump test+, and no one was biofilm forming. Among the 42 isolates of DAEC (DA), the probe detected DAAC 52.4%. PCR showed adhesin *afa*/*Dr* (*daad*+/*afa*+) in 59.5% and AIDA-I adhesin was not found, suggesting that other adhesins are involved in DAEC adhesion. afa/Dr DAEC isolates were significant among <5 years. In aEPEC, the genes of pathogenicity island OI-122 (*nleE*, *efa1*/*lifA* and *paa*) and were seen in 30% all from <5 years. Virulence characteristics of tEAEC and DAEC Afa/Dr suggest that subpopulations are related diarrhea. CLA does not appear to be a EAEC variant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – População que tem acesso a boas condições de saneamento básico (2010) (WHO, 2012)

Figura 2 – Micrografias eletrônicas de varredura (A) e de transmissão (B) com característica formação de pedestal de lesão A/E das bactérias aderentes (setas). Adaptado de Wong e colaboradores (2011).

Figura 3 – Padrões de aderência em cultura de células Hep-2. (A) Aderência Localizada (LA), típico de tEPEC; (B) Aderência Difusa (DA), padrão ouro para identificação de DAEC; (C) Aderência Agregativa (AA), padrão ouro para identificação de EAEC; (D) Aderência Localizada-Like (LAL), observado em algumas cepas de aEPEC. Fonte: SCALETSKY *et al* (1999)

Figura 4 – Padrão de aderência *chain-like adhesion* (CLA) em cultura de células HEp-2, com tempo de incubação de 3 horas e coloração com azul de metileno. Fonte: GIOPPO *et al.* (2000)

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio com produtos de amplificação obtidos em Ensaio 1 de PCR *multiplex* com iniciadores para os genes *eae* e *aat* (CVD432). Coluna 1: padrão de peso molecular 100 pb; Coluna 2-4, 6 e 7: amostras positivas para *aat* (630 pb); Colunas 5 e 9: amostras negativas; Colunas 8, 10 e 11: amostras positivas para *eae* (917 pb); Coluna 12: Controles positivos EPEC E2342/69 e EAEC 042; Coluna 13: Controle Negativo.

Figura 6 – Aderência em cultura de células Hep-2 após 3 horas de incubação, corado com *Giemsa*, visualização em aumento de 40X. A: Aderência Difusa (DA); B: Aderência Agregativa (AA); C: *Chain Like Adhesion* (CLA).

Figura 7 - Diagrama de Venn demonstrando a relação entre os testes realizados para pesquisa de EAEC, aderência agregativa (AA) em cultura de células HEp-2, detecção de *aat* por PCR e por hibridização (pAA).

Figura 8 - Diagrama de Venn demonstrando a relação entre os testes realizados para pesquisa de DAEC, aderência difusa (DA) em cultura de células HEp-2 e detecção de *daaC* por hibridização.

Figura 9 – Mapa do município de Vitória, dividido em Regiões de Saúde com porcentagem de DEC isoladas em relação ao número de amostras coletadas por região.

Figura 10 – Ensaio de capacidade de formação de biofilme de EAEC em placa de poliestireno com coloração por safranina. A intensidade da coloração é relacionada com a densidade óptica e com a formação de biofilme.

Figura 11 – Escores de formação de película na interface ar-líquido (controles). (A) Controle negativo (HB101); (B) 1+ (Q 447E*); (C) 2+ (Q 001A*); (D) 3+ (EAEC 042).

LISTA DE FLUXOGRAMAS, QUADROS E GRÁFICOS

Quadro 1 - Origem das amostras clínicas

Quadro 2 – Provas bioquímicas para identificação de *E. coli*

Quadro 3 – Patotipos diarreiogênicos de *E. coli* com seus respectivos genes de virulência, iniciadores, programas de amplificação e tamanhos de fragmentos obtidos após PCR *multiplex* e *monoplex**

Quadro 4 - Soluções de lise e desnaturação utilizadas no ensaio de hibridização de colônias na ordem cronológica em que foram utilizadas e tempo de incubação

Quadro 5 – Genes de virulência pesquisados nos patotipos de DEC

Quadro 6 – Descrição da PCR monoplex para detecção dos genes de virulência de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* (EAEC, DAEC, aEPEC ou CLA)

Quadro 7 – Descrição da PCR multiplex para detecção dos genes de virulência de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* (EAEC, DAEC, aEPEC ou CLA)

Fluxograma 1 – Representação esquemática da metodologia para identificação e caracterização fenotípica e genotípica dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli* e *Chain-Like Adhesion* (CLA)

Gráfico 1 – Número de amostras bacterianas coletadas, distribuídas pelos semestres compreendidos entre os anos 2008 e 2011

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fímbrias de aderência agregativa de EAEC

Tabela 2 - Distribuição segundo as faixas etárias dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli* isolados de indivíduos de todas as idades atendidos nas Unidades de Saúde de Vitória, ES

Tabela 3 - Presença de genes de virulência entre amostras de EAEC típicas e atípicas isoladas de indivíduos de todas as idades atendidos nas Unidades de Saúde de Vitória ES

Tabela 4 - Repertório de genes de virulência das 19 amostras de EAEC típicas

Tabela 5 - Repertório de genes de virulência das 41 amostras de EAEC atípicas

Tabela 6 – Distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC formadoras e não formadoras de biofilme

Tabela 7 - Ensaio de formação de película (escore) nas amostras de EAEC típicas e atípicas

Tabela 8 – Frequência dos genes de virulência pesquisados nos isolados de *E. coli* com padrão CLA

Tabela 9 - Repertório de genes de virulência nos 16 isolados de *E. coli* com padrão CLA

Tabela 10 - Presença de genes de virulência entre amostras de DAEC afa/Dr + e afa/Dr-

Tabela 11 - Repertório de genes de virulência entre os 42 isolados de DAEC

Tabela 12- Frequência dos genes de virulência pesquisados entre os isolados de aEPEC

Tabela 13- Repertório de genes de virulência entre os 10 isolados de aEPEC

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

x- Média

AA- Aderência agregativa

AAF- *Aggregative adherence fimbriae* (Fímbria de Aderência Agregativa)

AAF/I – Fímbria de Aderência Agregativa tipo I

AAF/II – Fímbria de Aderência Agregativa tipo II

AAF/III – Fímbria de Aderência Agregativa tipo III

AAF/IV – Fímbria de Aderência Agregativa tipo IV

aap – *Anti-aggregation protein* (proteina antiagregativa)

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

ag43 – Antígeno 43

aggR – *Aggregative regulator* (regulador de aderência agregativa)

AMP – adenosina monofosfato

AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

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

BHI – *Brain heart infusion* (infusão de cérebro e coração)

BSS – *Balanced Saline Solution* (solução salina balanceada)

BSS CMF - *Balanced Saline Solution* Ca^{2+} *and* Mg^{2+} *free* (Solução salina balanceada livre de Ca^{2+} e de Mg^{2+})

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CDEC – *Cell detaching E. coli* (*E. coli capaz de* destacar células)

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

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

DA – *Diffuse adherence* (Aderência difusa)

DAEC – *Diffusely adherent Escherichia coli* (*Escherichia coli* de aderência difusa)

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

DEC – *Escherichia coli* Diarreiogênica

DMEM – *Dulbecco´s minimum essential medium* (Meio Essencial Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – *Deoxyribonucleotide triphosphates* (Deoxinucleotídeo Trifosfato)

DO – Densidade óptica

DP – Desvio padrão

eae – EPEC *attaching and effacing* (aderência e achatamento de EPEC)

EAEC – *Enteroaggregative Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteroagregativa)

aEAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa atípica

tEAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa típica

EAF – EPEC *adherence fator* (fator de aderência de EPEC)

EAST1 – EAEC *heat-stable enterotoxin* 1 (Toxina temo estável de EAEC 1)

EHEC – *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteroemorrágica)

EIEC – *Enteroinvasive Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteroinvasora)

EPEC – *Enteropathogenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteropatogênica)

aEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

tEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica típica

EspA – EPEC *secreted protein* (Proteína secretada pela EPEC)

EspF – EPEC *secreted protein* (Proteína secretada pela EPEC)

ETEC – *Enterotoxigenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enterotoxigênica)

Gb3Cer – *Globotriaosylceramide* (Glicoesfingolipídeo globotriaosilceramida)

GMPc – *Cyclic guanosine monophosphate* (Monofosfato cíclico de guanosina)

GO – Goiás

HC – Hibridização de Colônia

HeLa – Linhagem celular de carcinoma cervical de Henriquetta Lacks

HEp-2 – Linhagem celular de carcinoma epidermóide de laringe humana

HIV – *Human immunodeficiency virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IL 1 – Interleucina 1

IL 2 – Interleucina 2

IL 8 – Interleucina 8

INF α – interferon α

LA – *Localized adherence* (Aderência Localizada)

LAL – *Localized-like adherence* (Aderência Localizada-*like*)

LabGIn – Laboratório de Gastroenterite Infecciosa

Lac + - Fermentadora da lactose

Lac - - Não fermentadora da lactose

LB – Luria Bertani (caldo Luria Bertani)

LEE – *Locus of enterocyte effacement* (*Locus* de achatamento de enterócito)

LPS – Lipopolissacarídeo

LT – *Heat Labile toxin* (enterotoxina termo-lábil)

MC – Ágar Mac Conkey

MILi – Motilidade, Indol, Lisina Descarboxilase

mL – Mililitros

µL – Microlitros

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

ORF – *Open reading frame* (região aberta de leitura)

pAA – *Plasmid of aggregative adhesion* (Plasmídio de aderência agregativa)

PAI – *Pathogenicity island* (Ilha de patogenicidade)

pb – pares de bases

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão salina fosfato)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia pela polimerase)

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

pInv – Plasmídio de Invasividade

SFB – Soro Fetal Bovino

ShET1 - *Shigella enterotoxin* 1 (enterotoxina tipo 1 de *Shigella*)

ST – *Heat Stable toxin* (Toxina termo estável)

SHU – Síndrome Hemolítica Urêmica

STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga

Stx – Toxina de Shiga

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

TSI – *Triple Sugar Iron* (Tríplice açúcar com ferro)

T3SS- *Type Three Secretion System* (Sistema de secreção tipo III)

US – Unidade de Saúde

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

UPEC – *Uropathogenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* uropatogênica)

UV – Luz ultravioleta

VMVP – caldo vermelho de Metila/Voges Proskauer

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....21

1.1 Gastroenterite.....21

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....26

2.1 *Escherichia coli*.....26

2.2 Patotipos diarreiogênicos de *Escherichia coli*.....27

2.2.1 *E. coli* enteropatogênica.....27

2.2.2 *E. coli* enterotoxigênica.....30

2.2.3 *E. coli* enteroinvasora.....31

2.2.4 *E. coli* enteroemorrágica.....32

2.2.5 *E. coli* enteroagregativa.....34

2.2.6 *E. coli* de aderência difusa.....37

2.3 Estudo laboratorial dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli* 39

2.3.1 Isolamento e identificação de *E. coli e* dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli*.....39

2.3.2 Sorologia.....39

2.3.3 Aderência em cultura de células.....40

2.3.4 Hibridização de colônias com sonda.....42

2.3.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....43

2.5.6 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real.....43

3. OBJETIVO.....44

3.1 Objetivo Geral.....44

3.2 Objetivos Específicos.....44

4.METODOLOGIA.....45

4.1 Tipo de estudo e amostra clínica 45

4.2 Identificação bioquímica.....47

4.3 Estoque das amostras.....47

4.4 Identificação dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli.*.....49

4.4.1 PCR *multiplex* e *monoplex* 49

4.4.2 Hibridização de colônias.....50

4.4.3 Teste de Adesão a células HEp-2.....51

4.5 Caracterização genotípica e fenotípica de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* e de amostras *chain-like adhesion* 53

4.5.1 Pesquisa de marcadores de virulência por PCR.....53

4.5.2 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica e de película por amostras de EAEC e CLA 57

4.6 Análise Estatística 58

4.7 Aspectos Éticos 59

4.8 Fluxograma da metodologia 59

5. RESULTADOS.....60

5.1 Amostras e identificação bacteriana.....60

5.2 Detecção dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli*.....60

5.2.1 Marcadores moleculares.....60

5.2.2 Teste de adesão em cultura de células.....61

5.2.3 Relação entre marcadores genéticos e adesão em cultura de célula na identificação de *E. coli* enteroagregativa e de *E. coli* de aderência difusa 62

5.2.4 Frequência dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli*.....63

5.3 Caracterização dos isolados de *E. coli* enteroagregativa 64

5.3.1 Determinação de genes de virulência por PCR 64

5.3.2 Formação de biofilme.....68

5.3.3 Análise da formação de película na interface ar-líquido 69

5.4 Caracterização dos isolados de *E. coli* com padrão CLA.....70

5.5 Caracterização dos isolados de *E. coli* de aderência difusa.....71

5.6 Caracterização dos isolados de *E. coli* enteropatogênica atípica.....73

6. DISCUSSÃO.....74

6.1 *E. coli* e patotipos diarreiogênicos.....74

6.2 Caracterização genotípica e fenotípica de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* e de *E. coli* com padrão CLA.....80

6.2.1 *E. coli* enteroagregativa.....80

6.2.2 *E. coli* com padrão CLA.....83

6.2.3 *E. coli* com padrão da aderência difusa.....84

6.2.4 *E. coli* enteropatogênica atípica.....86

7. CONCLUSÕES.....89

REFERÊNCIAS.....91

ANEXO 1 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....109

ANEXO 2 – Meios de cultura e soluções utilizados.....110

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gastroenterite

A gastroenterite é um importante problema de saúde pública, tratando-se da segunda principal causa de mortalidade infantil, precedida apenas por pneumonia (BOSCHI-PINTO, VELEBITB e SHIBUYAC, 2008; WHO, 2012; NATARO, 2013; WALKER, RUDAN, *et al.*, 2013). Em todo o mundo, responde por 17% das mortes em crianças menores de cinco anos, resultando em 1,3 milhões de mortes a cada ano, sendo mais prevalente em países em desenvolvimento, relacionado à falta de saneamento, higiene e água potável (BOSCHI-PINTO, VELEBITB e SHIBUYAC, 2008; WHO, 2012; NATARO, 2013). Em adultos, demanda dispendiosos gastos no sistema de saúde com consultas médicas e internações, além de ser amplamente associada às faltas no trabalho e diminuição da produtividade na população economicamente ativa (SVENUNGSSON, LAGERGREN, *et al.*, 2000).

A Figura 1 representa o acesso da população mundial às condições de saneamento básico, mostrando uma situação privilegiada para o Brasil, quando observado de um modo geral em relação a outros países do mundo. Entretanto, diferenças regionais são responsáveis por variações significativas na incidência da gastroenterite (MORENO, FILHO, *et al.*, 2010; SHAKOOR e ZAIDI, 2012)

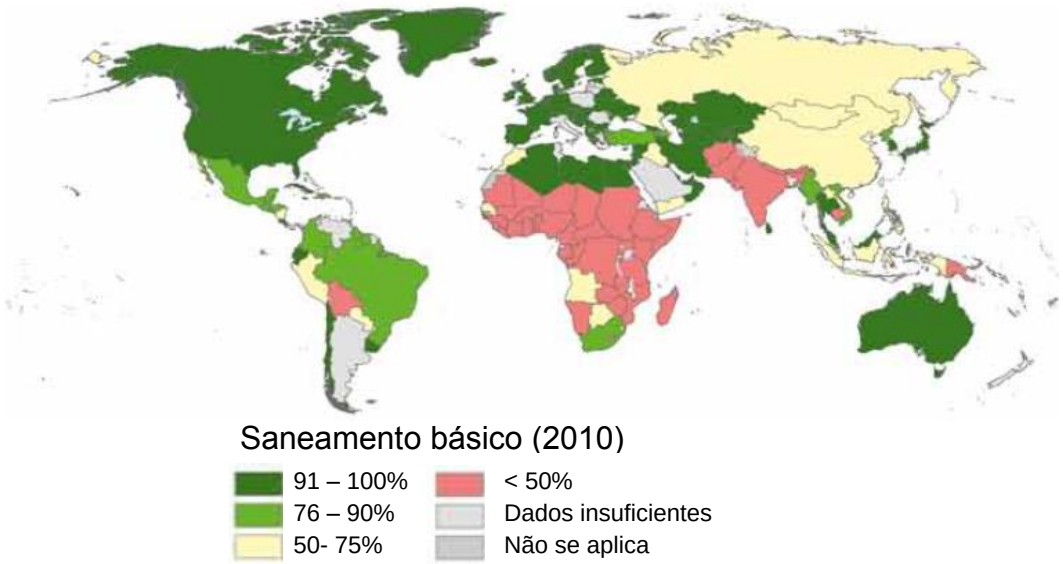


Figura 1 – População que tem acesso a boas condições de saneamento básico (2010) (WHO, 2012)

Em todo o Espírito Santo, no período de 2007 a 2010, foram notificados 264.950 casos de diarreia aguda, incluindo 91 surtos resultando em 13,8 a 23,7 casos por mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Dentre as causas infecciosas de diarreia, os agentes bacterianos ganham destaque em regiões de clima tropical e subtropical (NATARO e KAPER, 1998; ALBERT, FARUQUE, *et al.*, 1999; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002a; MORENO, FILHO, *et al.*, 2010; SHAKOOR e ZAIDI, 2012; NATARO, 2013). Dentre estes, a *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) desempenha um papel importante (RODRIGUES, ACOSTA, *et al.*, 2002; RODRIGUES, THOMAZINI, *et al.*, 2004; SAMAL, KHUNTIA, *et al.*, 2008; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008; SHAKOOR e ZAIDI, 2012). Seis patotipos de DEC são conhecidos e classificados, com base na patogênese, manifestações clínicas e pela presença de fatores de virulência, em: *E. coli* enteropatogênica típica (tEPEC) e atípica (aEPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroemorrágica (EHEC)/ *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* com aderência difusa (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998).

Dentre os patotipos de DEC, as EAEC e aEPEC têm emergido como importantes patógenos associados à diarreia no Brasil e no mundo (SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002b; HIEN, SCHEUTZ, *et al.*, 2008; OCHOA, ECKER, *et al.*, 2009; USEIN, CHITOIU, *et al.*, 2009; VILCHEZ, REYES, *et al.*, 2009; OCHOA, MERCADO, *et al.*, 2011; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013). DAEC tem sido relatada em alta frequência e associada à diarreia infantil dependente da idade e recentemente, em adultos (SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002a; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA e GIUGLIANO, 2013). Entretanto, tanto a DAEC, quanto EAEC e aEPEC são encontradas em indivíduos assintomáticos (SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002b; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013). Estes patotipos apresentam grande heterogeneidade genética.e sendo assim, a pesquisa de genes de virulência é uma importante ferramenta para identificar cepas com maior potencial de patogenicidade para causar diarreia (AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; MOHAMED, HUANG, *et al.*, 2007; HERNANDES, ELIAS, *et al.*, 2009; MORENO, FILHO, *et al.*,

2010; BOISEN, SCHEUTZ, *et al.*, 2012; MONFARDINI, 2012; LIMA, BOISEN, *et al.*, 2013).

A prevalência dos patotipos de DEC como causa de gastroenterite na população tem sido subestimada devido a limitações nos métodos laboratoriais de rotina, que são restritos à sorologia para detecção do patotipo EIEC e ao sorotipo protótipo de EHEC (O157:H7), raros no Brasil (SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002a; REGUA-MANGIA, GOMES, *et al.*, 2004; FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; KONEMAN, WINN, *et al.*, 2006; TRABULSI e ALTERTHUM, 2008; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008). Além disso, apesar dos patotipos aEPEC, EAEC, EHEC/STEC, EIEC e ETEC causarem diarreia em adultos e crianças, grande parte dos estudos realizados sobre a prevalência destes patógenos na diarreia restringe-se a crianças. Diante disso, torna-se importante a realização de estudos que evidenciem todos os patotipos de DEC em indivíduos de todas as idades que podem inclusive servir como reservatório para transmissão a susceptíveis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* é um bacilo gram negativo, com maioria de cepas móveis, que pertence à família *Enterobacteriaceae* e à tribo *Escherichia* (NATARO e KAPER, 1998). Foi identificada em 1885 e desde então é uma das espécies bacterianas mais bem estudadas e conhecidas, devido à facilidade de crescimento em cultura, de manuseio laboratorial, pela possibilidade de manipulação genética e capacidade de adquirir elementos gênicos móveis (CLEMENTS, YOUNG, *et al.*, 2012).

As *E. coli* são componentes da microbiota normal do trato gastrointestinal humano e de animais, iniciando a colonização horas após o nascimento (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). As cepas comensais raramente causam doença no trato gastrointestinal, exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou quando ocorre o rompimento das barreiras de defesa do organismo (NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Entretanto, algumas cepas de *E. coli* podem causar doença fora do trato intestinal, as denominadas patógenas extra intestinais (*E. coli* extra intestinal – ExPEC) ou mesmo no trato gastrointestinal (DEC), de acordo com seus genes de virulência ou características clínicas (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

As ExPEC podem causar vários tipos de infecções no organismo humano, sendo as mais comuns as infecções do trato urinário (ITUs), causadas pelas *E. coli* uropatogênicas (UPEC); além de meningite e sepse, causadas pelas *E. coli* associadas à meningite (MNEC) (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; JOHNSON e RUSSO, 2005; CROXEN e FINLAY, 2010). As DEC compreendem patotipos capazes de causar gastroenterite que apresentam genes de virulência cromossômicos e/ou plasmidiais , e podem ser classificados, conforme patogênese e características de virulência, em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroemorrágica (EHEC) ou produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998).

A infecção do trato gastrointestinal humano por uma DEC pode ocorrer, de um modo geral, após o consumo de água ou alimentos contaminados com fezes de humanos

ou de animais, como carne mal cozida ou alimentos frescos, tais como frutas e saladas mal lavadas. Também pode ocorrer a transmissão pessoa-pessoa em comunidades com poucas condições de higiene (BERGER, SODHA, *et al.*, 2010).

2.2 Patotipos diarreiogênicos de *Escherichia coli*

Os seis patotipos de DEC reconhecidos até o momento serão brevemente abordados a seguir. Além desses, estudos recentes sugerem dois novos patotipos: *E. coli* aderente e invasiva (AIEC) que não causa gastroenterite, mas tem associação possível com doença de Crohn (CROXEN e FINLAY, 2010) e; *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina de Shiga (Stx) (STEAEC), que foi responsável por um surto de gastroenterite associado à síndrome hemolítica urêmica em 2011 na Europa (CLEMENTS, YOUNG, *et al.*, 2012).

2.2.1 *E. coli* enteropatogênica

Foi isolada e identificada pela primeira vez em 1945 por John Bray como uma cepa de *E. coli* responsável por um grande surto de gastroenterite infantil no Reino Unido (BRAY, 1945). Os primeiros isolados de EPEC foram descritos como sendo um grupo de *E. coli* sorologicamente distintas, isoladas de crianças com diarreia e não de saudáveis (BRAY, 1945). Para facilitar o diagnóstico, sorogrupos clássicos de EPEC (O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158) foram determinados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1987). Posteriormente, a EPEC foi reconhecida como pertencente ao grupo de patógenos intestinais capazes de causar lesão do tipo *Attaching and Effacing* (A/E), propriedade compartilhada pela EHEC, EPEC de coelho (REPEC) e *Citrobacter rodentium* (NATARO e KAPER, 1998; ROBINS-BROWNE e HARTLAND, 2002; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

A lesão A/E é um tipo especial de lesão que ocorre na superfície apical dos enterócitos, caracterizada pelo achatamento das microvilosidades seguido pela aderência íntima da bactéria à célula, polimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto e formação de estruturas semelhantes a pedestal (MOON, WHIPP, *et al.*, 1983; NATARO e KAPER, 1998) (Figura 2).

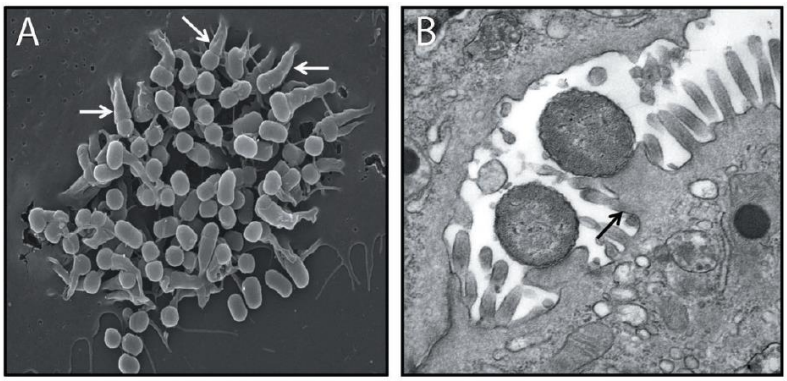


Figura 2 – Micrografias eletrônicas de varredura (A) e de transmissão (B) com característica formação de pedestal de lesão A/E das bactérias aderentes (setas). Adaptado de Wong e colaboradores (2011).

Os genes responsáveis pela lesão A/E estão localizados em ilha de patogenicidade (PAI – *Pathogenicity Island*) do cromossomo bacteriano, denominada região LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*). Esta PAI possui genes codificam a intimina, seu receptor TIR (*translocated intimin receptor*), componentes estruturais do sistema de secreção tipo III (T3SS – *Type Three Secretion System*) e todas as proteínas que serão translocadas para o interior da célula eucariota, além de genes reguladores e chaperonas (MCDANIEL, JARVIS, *et al.*, 1995; ELLIOTT, WAINWRIGHT, *et al.*, 1998).

O gene *eae* (*attaching and effacing*) codifica a intimina, proteína de membrana externa, responsável pela aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal e pela reorganização do citoesqueleto (MOON, WHIPP, *et al.*, 1983). Mais de 20 tipos de intimina são conhecidos (LACHER, STEINSLAND e WHITTAM, 2006).

O T3SS é estruturalmente composto por uma ATPase citosólica, por proteínas transmembrana em formato de anel, um eixo periplasmático e uma proteína extracelular em formato de agulha formado pela polimerização de subunidades da proteína EspA (EPEC *secreted protein* A), que atua na ligação inicial da bactéria à célula hospedeira, através do qual são translocadas as proteínas Esp (EPEC *secreted protein*) - EspB e EspD - até a membrana da célula hospedeira, onde formam um poro (GHOSH, 2004). As proteínas efetoras translocadas para o interior da célula hospedeira são codificadas na região LEE, em profagos e em outros elementos integrativos do DNA (GHOSH, 2004; TOBE, BEATSON, *et al.*, 2006). O receptor de intimina, TIR, é translocado até a membrana da célula hospedeira, liga-

se à intimina exposta na superfície da bactéria, formando a ligação íntima bactéria - célula hospedeira (JERSE, YU, *et al.*, 1990; KENNY, DEVINNEY, *et al.*, 1997).

Em 1995, a EPEC foi dividida em dois grupos, EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC), visto que a tEPEC possui, adicionalmente à região LEE, o plasmídio EAF (EPEC *Adherence Factor*) (KAPER, 1996). Este plasmídio abriga o gene *bfp*, codificante do pilus de aderência íntima tipo 4 BFP (*bundle-forming pilus*), que liga uma bactéria à outra, possibilitando a formação de micro colônias (GIRON, HO e SCHOOLNIK, 1991; KAPER, 1996). A aEPEC, por outro lado, não possui o plasmídio EAF e portanto não codifica o pilus BFP, mas apresenta adicionalmente grande diversidade de fatores de virulência, codificados por genes abrigados na região LEE, em outras partes do genoma ou em plasmídios (VIEIRA, ANDRADE, *et al.*, 2001; DULGUER, FABBRICOTTI, *et al.*, 2003; MORABITO, TOZZOLI, *et al.*, 2003; AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; HERNANDES, VIEIRA, *et al.*, 2006; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009; VIEIRA, SALVADOR, *et al.*, 2010).

Existem também diferenças epidemiológicas entre tEPEC e aEPEC. As amostras de tEPEC são reconhecidas como causa de gastroenterite apenas em crianças menores de um ano de idade e não são descritas na literatura em outros reservatórios diferentes do humano; ao passo que as amostras aEPEC são descritas como causa de gastroenterite em indivíduos de todas as idades e são encontradas em diferentes espécies de animais, incluindo gado, macacos, coelhos e cachorros (GOMES, IRINO, *et al.*, 2004; HERNANDES, VIEIRA, *et al.*, 2006; NATARO e KAPER, 1998; TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002).

Muitos estudos têm identificado marcadores de virulência de EHEC/STEC em isolados de aEPEC, significantemente associados com maior potencial de virulência, como os genes da PAI OI-122 (*efa1*/*lifA*, *set*/*ent*, *nlB*, *nlE* e *pagC*), característicos de EHEC O157 (KARMALI, MASCARENHAS, *et al.*, 2003; MORABITO, TOZZOLI, *et al.*, 2003; AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009; VIEIRA, SALVADOR, *et al.*, 2010). A PAI OI-122 localiza-se no cromossomo bacteriano, fisicamente ligada à região LEE, formando com esta uma grande PAI (MORABITO, TOZZOLI, *et al.*, 2003; BIELASZEWSKA, SONNTAG, *et al.*, 2007).

Dentre os principais possíveis fatores associados à virulência de aEPEC destacam-se: (i) Toxina LifA (*lymphocyte inhibitory factor*), capaz de inibir a ativação e

proliferação de linfócitos e a síntese de citocinas pró-inflamatórias (KLAPPROTH, SCALETSKY, *et al.*, 2000); (ii) adesina Efa1 (EHEC *Factor Adesin 1*), que apresenta 99,9% de similaridade com a toxina LifA (NICHOLLS, GRANT e ROBINS-BROWNE, 2000); (iii) proteínas efetoras nleB e nleE, envolvidas no bloqueio da resposta imune NF-κB (KELLY, HART, *et al.*, 2006; ZURAWSKI, MUMY, *et al.*, 2008; NADLER, BARUCH, *et al.*, 2010); (iv) enterotoxina codificada pelo gene *set*/*ent*, similar à produzida por EIEC e por *Shigella flexneri* (KARMALI, MASCARENHAS, *et al.*, 2003)*;* (v) longa fímbria polar tipo I (*lpfA*), envolvida na aderência da bactéria às células epiteliais (BAUMLER e HEFFRON, 1995; DOUGHTY, SLOAN, *et al.*, 2002); (vi) adesina *paa,* relacionada à lesão A/E no epitélio intestinal dos suínos (BATISSON, GUIMOND, *et al.*, 2003); (v) hemolisina *exhA*, toxina cito lítica, que leva à lise da célula hospedeira, quando secretada, atravessa o epitélio vascular e liga-se às células sanguíneas causando hemólise (MAGALHÃES, ROSSATO, *et al.*, 2011); (vii) gene *pagC*, similar ao de *Salmonella enterica* Typhimurium, essencial para a sobrevivência da bactéria no interior de macrófagos (KARMALI, MASCARENHAS, *et al.*, 2003); (viii) gene *ureD* associado à urease (STEYERT, RASKO e KAPER, 2011).

2.2.2 *E. coli* enterotoxigênica

ETEC é a principal causa da diarreia dos viajantes, principalmente em militares provenientes de países desenvolvidos que viajam para áreas subdesenvolvidas e em turistas que viajam para regiões menos desenvolvidas, especialmente áreas de clima tropical, como América Latina (QADRI, SVENNERHOLM, *et al.*, 2005; SHAH, DUPONT e RAMSEY, 2009).

A doença causada por ETEC caracteriza-se por uma diarreia secretória, de início súbito e auto limitada. Normalmente a doença resolve-se sem tratamento em menos de uma semana (WOLF, 1997). Complicações podem ocorrer por conta da desidratação devido à perda de eletrólitos, principalmente em imunocomprometidos e em crianças; nesses casos a reposição hidroeletrolítica é importante (NATARO e KAPER, 1998; QADRI, SVENNERHOLM, *et al.*, 2005). Em países subdesenvolvidos, a ETEC está entre as principais causas de mortalidade infantil (TURNER, SCOTT-TUCKER, *et al.*, 2006).

A diarreia inicia-se 12 a 72 horas após a ingestão de água ou alimentos contaminados com uma grande dose infecciosa (10^8 – 10^{13} UFC), menor em

crianças (CHIN, 2000). A ETEC adere-se ao epitélio do intestino delgado por meio de fatores de colonização (CF) e adesinas tia e tib (EVANS, SILVER, *et al.*, 1975; CASSELS e WOLF, 1995; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; CLEMENTS, YOUNG, *et al.*, 2012).

O principal mecanismo de patogenicidade da ETEC é a secreção de enterotoxinas plasmidiais, que podem ser do tipo termoestável (ST) ou termo lábil (LT) (DALLAS e FALKOW, 1980). A cepa pode expressar apenas uma ou ambas as enterotoxinas (DALLAS e FALKOW, 1980; NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). A toxina LT é composta por uma subunidade A e cinco subunidades B (AB_5). Sua sequência de aminoácidos apresenta 80% de homologia com a toxina da cólera (CT), secretada pelo *Vibrio cholerae*, com a qual apresenta mecanismo de ação similar (DALLAS e FALKOW, 1980; SPANGLER, 1992). É transportada para fora da bactéria por um sistema de secreção tipo II (TAUSCHEK, REBECCA, *et al.*, 2002) ou em vesículas do tipo *outer membrane vesicles* (OMVs) e liga-se, via subunidade B, ao receptor de membrana gangliosídeo GM1 do enterócito, é endocitada e transportada até o citosol, onde mantém ativada a adenilato ciclase, com consequente aumento na concentração intracelular do mensageiro secundário AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), levando à secreção de água e eletrólitos, o que causa diarreia aquosa (EVANS, CHEN, *et al.*, 1972; KESTY, MASON, *et al.*, 2004). A toxina ST é um peptídeo de 2 kDa semelhante ao hormônio intestinal guanilina, liga-se ao receptor guanilato ciclase, desencadeia uma sinalização intracelular que aumenta a concentração de GMPc (monofosfato cíclico de guanosina), desregulando a absorção e secreção de íons, o que causa diarreia aquosa (SCHULZ, GREEN, *et al.*, 1990).

2.2.3 *E. coli* enteroinvasora

A EIEC é o único patotipo de DEC que compreende patógenos verdadeiramente intracelulares (NATARO e KAPER, 1998). É relacionada bioquímica, genética e patologicamente à *Shigella* spp, sendo que alguns estudos relatam que esses dois microrganismos são indistinguíveis ao nível de espécie (SCHROEDER e HILBI, 2008; SASAKAWA, 2010). A doença caracteriza-se por diarreia aquosa com possibilidade de evolução para disenteria, com fezes escassas contendo sangue e muco. O que difere a infecção por EIEC da shiguelose, é que um maior número de

pacientes infectados por *Shigella* spp evoluem para disenteria (NATARO, SERIWATANA, *et al.*, 1995; SCHROEDER e HILBI, 2008; SASAKAWA, 2010).

EIEC e *Shigella* spp infectam as células do cólon, invadem as células M e os macrófagos por endocitose e penetram nos enterócitos pela superfície basolateral. No interior da célula, lisam a vesícula de endocitose, multiplicam-se e movem-se utilizado os filamentos de actina do citosol até os polos da célula, de onde invadem as células epiteliais adjacentes. Leva à morte celular por apoptose, causando inflamação e consequente destruição da mucosa do cólon (MOUNIER, VASSELON, *et al.*, 1992; SANSONETTI, 1992; GOLDBERG e SANSONETTI, 1993; ADAM, ARPIN, *et al.*, 1995; SANSONETTI, 2001). Todos os genes necessários para a invasividade da EIEC estão localizados no plasmídio pINV (SMALL e FALKOW, 1988). Adicionalmente, EIEC e *Shigella* spp elaboram e secretam enterotoxinas, sendo a principal a Enterotoxina 1 de *Shigella* (ShET1) que contribui para a patogênese da diarreia aquosa (HENDERSON, CZECZULIN, *et al.*, 1999).

2.2.4 *E. coli* enteroemorrágica

A *E. coli* enteroemorrágica (EHEC) foi identificada como causa de doença em humanos em 1982, nos Estados Unidos, durante surtos de gastroenterite grave causada por ingestão de carne de hambúrguer contaminada em uma rede de *fast food* e em casos de síndrome hemolítica urêmica (SHU) associada a citotoxinas produzidas por *E. coli* (KARMALI, STEELE, *et al.*, 1983; RILEY, REMIS, *et al.*, 1983). Desde então, a EHEC tem sido identificada em várias regiões do mundo (PATON e PATON, 1998; NATARO e MOBLEY, 2004; EPPINGERA, MAMMELC, *et al.*, 2011; CLEMENTS, YOUNG, *et al.*, 2012).

EHEC apresenta a região LEE em seu genoma, portanto são patógenos capazes de causar lesão A/E (NATARO e KAPER, 1998). Mas o principal mecanismo de virulência deste patotipo é a produção de Verocitotoxinas (VT), também denominadas toxinas de Shiga (Stx), similares às toxinas produzidas por *Shigella dysenteriae*, e podem ser do subgrupo 1 (Stx1) ou do subgrupo 2 (Stx2) (KARMALI, STEELE, *et al.*, 1983; O'BRIEN e HOLMES, 1987; PATON e PATON, 1998). Uma única cepa pode produzir toxinas de apenas um ou dos dois tipos (BRETT, HORNITZKY, *et al.*, 2003; BLANCO, PADOLA, *et al.*, 2004). Cepas de *E. coli* produtoras das toxinas Stx que não possuem em seu genoma a região LEE são

denominadas VTEC (*E. coli* produtora de Vero toxina) ou STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga), termo geral mais utilizado atualmente para denominar cepas produtoras da(s) toxina(s) Stx (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

A dose infecciosa é baixa (menos de 100 células bacterianas), pois este patotipo resiste aos ácidos do estômago (BELL, GOLDOFT, *et al.*, 1994). As toxinas produzidas após colonização no cólon passam para a corrente sanguínea e ligam-se às células endoteliais microvasculares do glomérulo renal, do cérebro e intestino, onde inibem a síntese de proteínas (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Levam à micro angiopatia por meio da toxicidade direta e indução da produção local de citocinas e de quimiocinas, resultando em inflamação (KARCH, MELLMANN e BIELASZEWSKA, 2009). Ocorre um sério dano renal que resulta em Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda que pode ser fatal (KARMALI, STEELE, *et al.*, 1983; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Os principais grupos de risco para desenvolvimento de doença renal são as crianças menores de dez anos e os idosos, sendo que as crianças menores de quatro anos são as principais vítimas (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). A SHU é fatal em 3 a 5% dos casos envolvendo crianças e 12 a 30% das afetadas sobrevivem com sequelas neurológicas ou comprometimento da função renal (NATARO e KAPER, 1998; PATON e PATON, 1998).

A EHEC/STEC faz parte do trato gastrointestinal de animais de fazenda (bovinos, ovinos e caprinos) e de animais selvagens, sem causar doença nesses animais, o que possibilita o surgimento de fontes de infecção para os seres humanos, incluindo alimentos de origem animal e vegetal (KARCH, MELLMANN e BIELASZEWSKA, 2009). Em todo o mundo já foram relatados surtos relacionados ao consumo de carne de hambúrguer mal cozida, salsichas, leite não pasteurizado, alface, melão, suco de maçã, brotos de rabanete, entre outros alimentos (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Atualmente com a distribuição globalizada de alimentos a infecção por EHEC/STEC torna-se um problema ainda maior (WERBER, KRAUSE, *et al.*, 2012).

2.2.5 *E. coli* enteroagregativa

A *E. coli* enteroagregativa (EAEC) foi um dos últimos patotipos a ser descrito, em 1985, com um padrão de aderência em cultura de células HEp-2 diferente do padrão até então conhecido de EPEC (NATARO, KAPER, *et al.*, 1987). Foi descrita como o principal agente etiológico causador de diarreia persistente com duração de mais de 14 dias (BHAN, RAJ, *et al.*, 1989). É caracterizada por aderir-se em cultura de células HEp-2 ou HeLa em presença de manose com padrão de aderência agregativa (AA) e por não secretar as enterotoxinas LT e ST de ETEC (NATARO e KAPER, 1998). As amostras apresentam grande heterogeneidade quanto à presença de diversos fatores prováveis de virulência (NATARO, KAPER, *et al.*, 1987; NATARO e KAPER, 1998; NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998; PIVA, PEREIRA, *et al.*, 2003; HUANG, MOHAMED, *et al.*, 2007; BOISEN, SCHEUTZ, *et al.*, 2012; MONFARDINI, 2012; LIMA, BOISEN, *et al.*, 2013)

A gastroenterite inicia-se de 8 a 18 horas após a ingestão de aproximadamente 10^{10} UFC (NATARO, DENG, *et al.*, 1995). Aderem às células epiteliais que formam as camadas mucosas do intestino delgado e grosso (KNUTTON, SHAW, *et al.*, 1992; HICKS, CANDY e PHILLIPS, 1996). As manifestações clínicas da doença são diarreia aquosa, mucosa e secretória, em alguns casos também pode ocorrer febre baixa e/ou vômito (BHAN, RAJ, *et al.*, 1989)

As infecções por EAEC ocorrem principalmente em crianças e em países em desenvolvimento (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998). Entretanto, este patotipo também é causa de diarreia persistente em adultos, tratando-se do segundo principal agente bacteriano causador de gastroenterite em turistas que viajam para áreas menos desenvolvidas (HUANG, NATARO, *et al.*, 2006; SHAH, DUPONT e RAMSEY, 2009). A EAEC também é um patógeno importante em países desenvolvidos, onde tem sido identificado em surtos (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998), além de ser um importante microrganismo causador de gastroenterite em pacientes imunocomprometidos (NATARO, MAI, *et al.*, 2006).

O fenótipo AA é associado à presença dos plasmídios pAA (pAA1 ou pAA2). O primeiro descrito, pAA1, possui 60 MDa, foi identificado em EAEC 17-2 O3:H2, isolada de criança chilena com diarreia, possui os genes que codificam a fímbria de aderência agregativa I (AAF/I), o regulador transcripcional *AggR* e a toxina EAST1

(NATARO, DENG, *et al.*, 1994; VIAL, ROBINS-BROWNE, *et al.*, 1988; SAVARINO, FASANO e ROBERTSON, 1991; NATARO, DENG, *et al.*, 1992). O plasmídio pAA2 apresenta aproximadamente 100 Kb, foi identificado em EAEC 042 O44:H18 isolada de criança peruana com diarreia e codifica a enterotoxina *plasmid-encoded toxin* (Pet); a fímbria de aderência agregativa AAF/II; a enterotoxina SHET-1, o ativador transcripcional *aggR*, a toxina EAST1, a dispersina (gene *aap*) e seu transportador ABC (FASANO, NORIEGA, *et al.*, 1995; ESLAVA, NAVARRO-GARCÍA, *et al.*, 1998; CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999; SHEIKH, CZECZULIN, *et al.*, 2002; NISHI, SHEIKH, *et al.*, 2003; CHAUDHURI, SEBAIHIA, *et al.*, 2010).

O gene *aggR* é um ativador transcripcional que regula a transcrição de fatores de virulência plasmidiais e cromossômicos, importantes para a patogênese da EAEC, como as fímbrias de aderência agregativa (AAF), a dispersina e o sistema de secreção tipo IV (MORIN, TIRLING, *et al.*, 2010). Este, identificado pela primeira vez no plasmídio pAA, também pode ser encontrado na PAI *pheUI* do cromossomo bacteriano (NATARO, DENG, *et al.*, 1994; HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2006). A presença do gene *aggR* classifica as cepas de EAEC como EAEC típicas (tEAEC) e sua ausência, como EAEC atípicas (aEAEC) (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; NATARO, 2005).

É proposto um modelo de três estágios para a patogênese da EAEC com (i) aderência bacteriana, (ii) produção de biofilme e aumento da secreção de muco pelos enterócitos, (iii) secreção de toxinas e indução de resposta inflamatória com dano na mucosa intestinal (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998; HUANG e DUPONT, 2004; HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2006; MOHAMED, HUANG, *et al.*, 2007; FLEMMING e WINGENDER, 2010). A aderência da bactéria à borda em escova das células epiteliais pode ocorrer por meio de AAF em formato de feixe, da adesina Hda (Tabela 1) e de outras adesinas ainda não conhecidas (NATARO, DENG, *et al.*, 1992; SAVARINO, FOX, *et al.*, 1994; CZECZULIN, BALEPUR, *et al.*, 1997; BERNIER, GOUNON e LE BOUGUÉNEC, 2002; BOISEN, STRUVE, *et al.*, 2008). A proteína dispersina contribui para a maior eficiência da colonização (SHEIKH, CZECZULIN, *et al.*, 2002) com a dispersão bacteriana pela mucosa intestinal e estabelecimento de novos focos de infecção (HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2006; NISHI, SHEIKH, *et al.*, 2003).

Tabela 1- Fímbrias de aderência agregativa de EAEC

Proteína (gene)	Localização	Referencia
AAF/I - Fímbria de aderência agregativa I (*aggA*)	Plasmídio pAA1	(NATARO, DENG, *et al.*, 1992)
AAF/II - Fímbria de aderência agregativa II (*aafA*)	Plasmídio pAA2	(CZECZULIN, BALEPUR, *et al.*, 1997)
AAF/III - Fímbria de aderência agregativa III (*agg*-3A)	Plasmídio pAA2	(BERNIER, GOUNON e LE BOUGUÉNEC, 2002)
AAF/IV - Fímbria de aderência agregativa IV (*hda*)	Plasmídio pO86A1	(BOISEN, STRUVE, *et al.*, 2008)

A produção de biofilme é um mecanismo de virulência importante para EAEC, pois constitui um modo de proteção contra biocidas, antimicrobianos, além de ser um mecanismo de escape à resposta imunológica, possibilitando o crescimento bacteriano em um ambiente hostil e a permanência no hospedeiro (DONLAN e COSTERTON, 2002; FLEMMING e WINGENDER, 2010). A formação de biofilme está relacionada à colonização assintomática com grande número de portadores assintomáticos, à persistência da diarreia (≥ 14 dias) e à desnutrição por diminuir a absorção de nutrientes (NATARO e KAPER, 1998; MENDEZ-ARANCIBIA, VARGAS, *et al.*, 2008; BOLICK, HONTECILLAS, *et al.*, 2013). Um ciclo vicioso é formado: hospedeiros malnutridos apresentam menor capacidade de reparar os danos causados pela bactéria no trato gastrointestinal e são mais propensos a apresentar diarreia persistente, o que piora o estado nutricional do paciente (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998; BOLICK, HONTECILLAS, *et al.*, 2013).

A EAEC produz e secreta toxinas, dentre as principais destacam-se: (i) Enterotoxina ShET1, identificada em *Shigella flexneri* e associada a diarreia secretória; (ii) Enterotoxina termo estável (EAEST1), codificada pelo gene cromossômico *astA*, apresenta 38 aminoácidos homólogos a toxina ST de ETEC e contribui para a diarreia aquosa; (iii) Pet (pAA *plasmid-encoded toxin*), uma serina protease autotransportada com atividade citotóxica, conferida pela habilidade de clivar a espectrina, um componente da membrana e do citoesqueleto de células eucariotas; (iv) Sat (*secreted autotransporte toxin*), serino-protease autotransportada encontrada na família *Enterobacteriaceae* (SPATE) com atividade citopática e proteolítica (SAVANNO, FASANO, *et al.*, 1991; FASANO, NORIEGA, *et al.*, 1995; SAVARINO,

MCVEIGH, *et al.*, 1996; ESLAVA, NAVARRO-GARCÍA, *et al.*, 1998; NAVARRO-GARCÍA, ESLAVA, *et al.*, 1998; HENDERSON, CZECZULIN, *et al.*, 1999; GUYER, HENDERSON, *et al.*, 2000).

A EAEC e outros patotipos como DAEC adquirem íons férricos por sideróforos (queladores de ferro) e sistemas de transporte de heme (OKEKE, SCALETSKY, *et al.*, 2004). Os quelantes de ferro mais importantes são a aerobactina (gene *iucA*) e a yersiniabactina (gene *irp2*), originalmente descrita em *Yersinia* spp (SCHUBERT, RAKIN, *et al.*, 1998; CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999; OKEKE, SCALETSKY, *et al.*, 2004). O sistema de transporte de heme Chu (gene *chuA*) codifica uma proteína de 69 KDa com função de receptor de membrana externa para transporte do heme (TORRES e PAYNE, 1997; OKEKE, SCALETSKY, *et al.*, 2004).

2.2.6 *E. coli* de aderência difusa

A DAEC foi o sexto patotipo de DEC identificado (NATARO e KAPER, 1998). É definida pelo seu padrão de aderência difusa sobre monocamada de células HeLa ou HEp-2 e ausência de marcadores de virulência de outros patotipos de DEC (SCALETSKY, SILVA e TRABULSI, 1984; NATARO, KAPER, *et al.*, 1987; NATARO e KAPER, 1998). Essa definição inclui cepas uropatogênicas (envolvidas em pielonefrite, cistite e bacteriuria assintomática) e patógenos entéricos associados à diarreia dependente da idade (D'ORAZIO e COLLINS, 1998; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008).

A patogênese da DAEC inicia-se com a aderência ao enterócito por meio de adesinas (CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005). A primeira classe de adesinas relacionadas ao fenótipo DA são as fímbrias da família Afa/Dr, que são hemaglutininas manose resistentes, descritas inicialmente na cepa protótipo C1845; são encontradas em aproximadamente 75% das amostras que exibem o fenótipo DA e codificadas por genes plasmidiais ou cromossômicos que hibridizam com a sonda *daaC* (BILGE, CLAUSEN, *et al.*, 1989; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Essas adesinas ligam-se ao receptor *decay-accelerating factor* (DAF) e ao antígeno carcinoembrionário (CEACAM - *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*) (BILGE, CLAUSEN, *et al.*, 1989; NOWICKI, LABIGNE, *et al.*, 1990).

A segunda classe de adesinas envolvidas ao fenótipo DA é denominada AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence*), que compreende a outras proteínas de membrana externa, codificadas por genes plasmidiais e que também podem ser identificados em cepas de EPEC (*eae*+) com fenótipo DA (BENZ e SCHMIDT, 1993). Para funcionar como adesina madura, AIDA-I precisa ser glicosilada pela proteína Aah (*autotransporter adhesion heptosyltransferase*), uma (mono) heptosiltransferase específica, essencial para a função de AIDA-I (BENZ e SCHMIDT, 2001; TORRES, ZHOU e KAPER, 2005).

A patogênese da DAEC não é totalmente esclarecida e as cepas com fenótipo DA apresentam uma grande heterogeneidade de genes de virulência (CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005). Após a aderência da bactéria ao DAF, o enterócito sintetiza IL-8, que induz a migração transepitelial de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), estimulando a produção de TNFα e de IL-1β, que tornam a aderência bacteriana ao DAF mais firme (BÉTIS, BREST, *et al.*, 2003). A DAEC também interage com o PMN, via *pilus* tipo I, estimula a produção de IL-8, diminui a capacidade de fagocitose e induz a apoptose. (BREST, BÉTIS, *et al.*, 2004). O efeito citopático no enterócito promovido na infecção pela DAEC é caracterizado por longas projeções celulares em formato de dedo ao redor das bactérias aderidas, que protegem a bactéria da ação dos antimicrobianos e do sistema imune (YAMAMOTO, KOYAMA, *et al.*, 1992; BERNET-CAMARD, COCONNIER, *et al.*, 1996; PEIFFER, GUIGNOT, *et al.*, 2000).

Algumas cepas podem invadir e se replicar no interior das células epiteliais, principalmente no trato urinário (MULVEY, 2002). O processo de internalização é um mecanismo de escape à resposta imune inata e adaptativa que contribui para a permanência da bactéria no organismo (MULVEY, SCHILLING e HULTGREN, 2001). Além disso, toxinas, como ShET-1 e Sat, já foram reportadas fazendo parte da patogenicidade da DAEC (LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005; GUIGNOT, CHAPLAIS, *et al.*, 2007).

2.3 Estudo laboratorial dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli*

2.3.1 Isolamento e identificação de *E. coli e* dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli*

O isolamento de *E. coli* é fácil e rápido, basta que os espécimes clínicos sejam semeados em meios de cultura seletivos, como Agar Mac ConKey (MC) ou Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubados a 37°C em condições aeróbicas por cerca de 20 horas (NATARO e KAPER, 1998). A *E. coli* forma colônias com características morfológicas bem definidas e pode ser identificada por meio de testes bioquímicos automatizados ou manuais (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Os exames laboratoriais de rotina são restritos à identificação de poucos patotipos de DEC e os ensaios que identificam todos eles são realizados apenas em laboratórios de referência ou de pesquisa. A cultura de fezes para pesquisa de DEC em laboratórios de referência é realizada apenas em casos de diarreia persistente, especialmente em viajantes, crianças, imunocomprometidos e em surtos. Consequentemente, a frequência das DEC na gênese da diarreia é seriamente subestimada (NATARO e KAPER, 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; CLEMENTS, YOUNG, *et al.*, 2012).

2.3.2 Sorologia

Em 1944, Kauffman propôs um esquema para a classificação sorológica de *E. coli* que é utilizado até os dias atuais, de forma modificada, e caracteriza as cepas de *E. coli* por seus antígenos de superfície. O antígeno O (lipopolissacarídeo – LPS) define o sorogrupo ao qual a cepa pertence, por exemplo *E. coli* O157; e o antígeno O juntamente com o antígeno H (flagelar) definem o sorotipo ao qual a cepa pertence, por exemplo *E. coli* O157:H7 (NATARO e KAPER, 1998). Alguns sorogrupos/sorotipos são mais comuns a determinados patotipos, por exemplo, o sorotipo O26:H11 é comum entre isolados de EPEC e de EHEC, entretanto a identificação do sorotipo não caracteriza definitivamente o patotipo (TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002; CAMPOS, FRANZOLIN e TRABULSI, 2004; CLEMENTS, YOUNG, *et al.*, 2012).

2.3.3 Aderência em cultura de células

Inicialmente foram reconhecidos dois padrões de aderência em cultura de células HeLa ou HEp-2: (i) Aderência Localizada (LA), no qual as bacterias aderem-se umas às outras sobre as células, formando microcolônias e; (ii) Aderência Difusa (DA) (CRAVIOTO, GROOS, *et al.*, 1979; SCALETSKY, SILVA e TRABULSI, 1984). Mais tarde, observou-se que o padrão DA apresentava dois tipos de aderência diferentes, aderência difusa verdadeira (DA) em que as bactérias aderem-se de forma difusa sobre as células, e aderência agregativa (AA), no qual as bactérias aderem-se em um padrão que lembra "tijolos empilhados" (NATARO, KAPER, *et al.*, 1987). Atualmente, o ensaio de aderência em cultura de células é o padrão ouro para caracterizar os patotipos DAEC (DA) e EAEC (AA) (Figura 3) (BILGE, CLAUSEN, *et al.*, 1989; NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005).

O padrão LA também foi subdividido em dois: (i) Aderência Localizada (LA) (Figura 3), anteriormente descrito e característico de cepas de tEPEC que apresentam o pilus BFP responsável pela formação das micro colônias e; (ii) Aderência Localizada-Like (LAL) (Figura 3), no qual as bactérias aderem-se umas às outras de forma frouxa, formando micro colônias mais espalhadas, característico de cepas de aEPEC e só pode ser observado em ensaios de aderência com seis horas de incubação (SCALETSKY, PELAYO, *et al.*, 1996; SCALETSKY, PEDROSO, *et al.*, 1999). Algumas cepas de aEPEC podem apresentar ainda padrões de aderência característicos de outros patotipos ou podem não aderir-se em cultura de células (SCALETSKY, SILVA e TRABULSI, 1984; SCALETSKY, PELAYO, *et al.*, 1996; SCALETSKY, PEDROSO, *et al.*, 1999; VIEIRA, ANDRADE, *et al.*, 2001; TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002; DULGUER, FABBRICOTTI, *et al.*, 2003; NUNES, SARIDAKIS, *et al.*, 2003; GOMES, IRINO, *et al.*, 2004; HERNANDES, VIEIRA, *et al.*, 2006).

O último padrão de aderência identificado foi denominado *chain-like adhesion* (CLA), no qual as bactérias aderem-se em um formato de cadeia (Figura 4) (GIOPPO, ELIAS JR, *et al.*, 2000). O padrão CLA foi considerado uma variante do padrão AA, pois as primeiras amostras identificadas com este padrão apresentavam pelo menos uma sequência de genes descritos no protótipo EAEC 042 e, algumas amostras,

também os genes da adesina AAF/I e do ativador transcripcional *AggR* (GIOPPO, ELIAS JR, *et al.*, 2000; KAHALI, SARKAR, *et al.*, 2004; BHARDWAJ, MAJUMDAR, *et al.*, 2006). Entretanto, estudos recentes demonstram que nem todas as amostras CLA apresentam genes característicos de EAEC e que estas cepas ainda não são bem caracterizadas geneticamente (MONFARDINI, 2012).

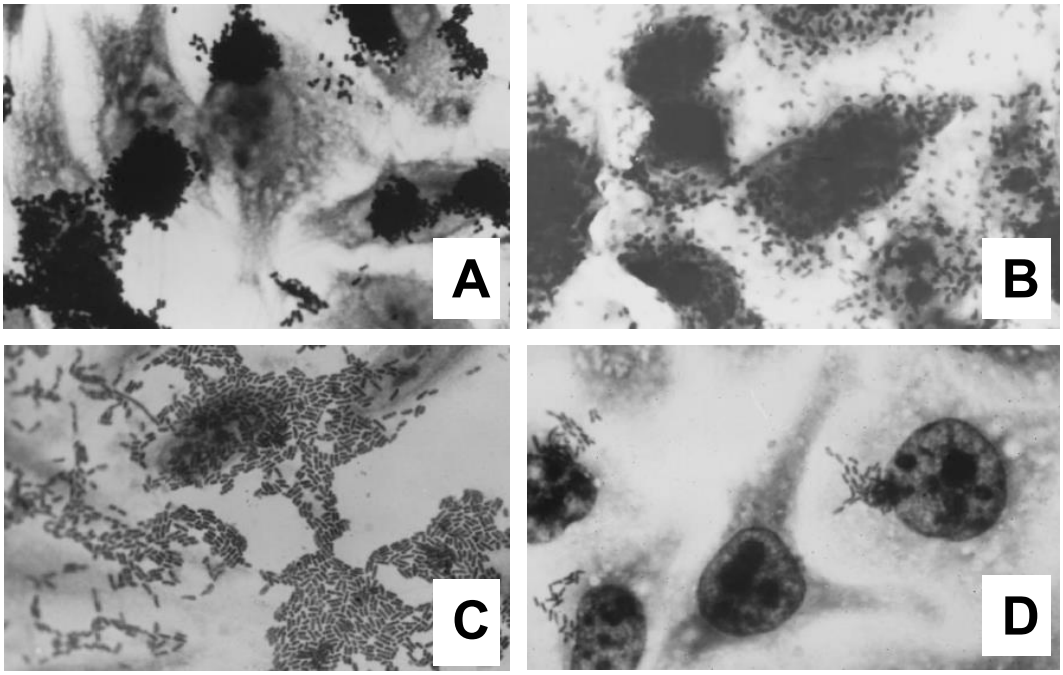


Figura 3 – Padrões de aderência em cultura de células Hep-2. (A) Aderência Localizada (LA), típico de tEPEC; (B) Aderência Difusa (DA), padrão ouro para identificação de DAEC; (C) Aderência Agregativa (AA), padrão ouro para identificação de EAEC; (D) Aderência Localizada-Like (LAL), observado em algumas cepas de aEPEC. Fonte: SCALETSKY *et al* (1999).

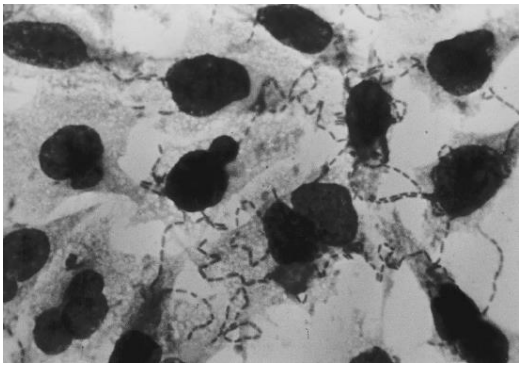


Figura 4 – Padrão de aderência *chain-like adhesion* (CLA) em cultura de células HEp-2, com tempo de incubação de 3 horas e coloração com azul de metileno. Fonte: GIOPPO *et al.* (2000).

2.3.4 Hibridização de colônias com sonda

As sondas constituem segmentos específicos de DNA ou RNA (polinucleotídeos ou oligonucleotídeos) de fita simples que hibridizam com uma região do material genético presente em colônia isolada do crescimento bacteriano (MOSELEY, ECHEVERRIA, *et al.*, 1982; BAUDRY, SAVARINO, *et al.*, 1990). As sondas de DNA devem ser marcadas com ^{32}P (sondas radioativas), biotina ou digoxigenina, sendo que as sondas radioativas são mais sensíveis, entretanto, necessitam de laboratórios preparados para seu manuseio. Como a meia vida dos radioisótopos é curta, a utilização de sondas não radioativas propiciaria a utilização da técnica em locais onde o uso de radioisótopos é impraticável (TENOVER, 1988).

A detecção de patotipos de DEC por hibridização de colônia (*colony blot*) tem sido utilizada desde 1982, quando foram descritas sondas capazes de hibridizar com os genes que codificam as enterotoxinas ST e LT de ETEC (MOSELEY, ECHEVERRIA, *et al.*, 1982). As sondas de DNA apresentam alta sensibilidade e especificidade para detectar ETEC (genes *lt* e/ou *st*), EIEC (gene *ipaH*, do plasmídio pINV), EHEC (genes *stx1*, *stx2* e *eae*), STEC (genes *stx1* e/ou *stx2*), EPEC (genes *eae* e *bfp*) e constituem o padrão ouro para identificação destes patotipos (NATARO e KAPER, 1998).

Os patotipos DAEC e EAEC não apresentam um marcador de virulência presente em 100% das amostras, o que torna a identificação genética desses patotipos limitada (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; CLEMENTS, YOUNG, *et al.*, 2012).

Para *screening* de EAEC, um fragmento críptico de 1 Kb isolado do plasmídio pAA2 é utilizado como sonda (CVD 432 *probe* ou AA *probe*), atualmente denominado *aat* (gene transportador de proteína anti-agregação) (BAUDRY, SAVARINO, *et al.*, 1990; OKEKE, OLADIPUPO, *et al.*, 2003; PIVA, PEREIRA, *et al.*, 2003; WEINTRAUB, 2007; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008). Entretanto, esta sonda identifica apenas uma parte das amostras que exibem o fenótipo AA (CERNA, NATARO e ESTRADA-GARCIA, 2003; HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2006; WEINTRAUB, 2007). O mesmo ocorre para DAEC, em que muitos estudos epidemiológicos utilizam a sonda *daaC*, também denominada *afaBC*, para *screening* de DAEC. Esta sonda hibridiza

com os genes que codificam as adesinas da família Afa/Dr, porém este marcador genético não está presente em 100% das amostras que exibem o fenótipo DA (JALLAT, LIVRELLI, *et al.*, 1993; CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005).

2.3.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A PCR é um método de amplificação do DNA sem utilização de microrganismos vivos descrito em 1983 por Kary Mullis. Trata-se de uma alternativa rápida, simplificada e muito utilizada para detecção dos principais patotipos de DEC (LÓPEZ-SAUCEDO, CERNA, *et al.*, 2003; ARANDA, FAGUNDES-NETO e SCALETSKY, 2004; ARANDA, FABBRICOTTI, *et al.*, 2007; FIALHO, DE SOUZA, *et al.*, 2013). Dentre os ensaios de PCR disponíveis, dois ensaios *multiplex* sensívies e específicos foram utilizados neste estudo (ARANDA, FAGUNDES-NETO e SCALETSKY, 2004).

2.3.6 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real

A evolução da técnica de PCR é a PCR em tempo real (*Real-time PCR*), que além da amplificação do material genético, possibilita a quantificação por fluorescência em uma única etapa, sem necessidade de manipulação do material genético amplificado, o que diminui o risco de contaminação e o tempo de trabalho, tornando a liberação do resultado mais rápida, precisa e segura, além de demandar um menor espaço físico do laboratório (MORRISON, WEIS e WITTWER, 1998; BELLIN, PULZ, *et al.*, 2001). Trabalhos recentes têm descrito metodologias sensíveis e específicas para identificação dos seis patotipos de DEC em um único ensaio, utilizando em uma única reação *pools* contendo cinco amostras de *E. coli* (GUION, OCHOA, *et al.*, 2008; BARLETTA, OCHOA, *et al.*, 2009; SOUZA, LOZER, *et al.*, 2013).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Determinar a frequência dos patotipos diarreiogênicos de *Escherichia coli* e descrever as características fenotípicas e genotípicas dos patotipos *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteropatogênica atípica e *E. coli* de aderência difusa e de *E. coli chain-like adhesion*, isoladas de indivíduos de todas as idades com gastroenterite, atendidos nas Unidades de Saúde do Município de Vitória, ES.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Identificar *E. coli* de espécimes fecais por métodos fenotípicos;

3.2.2 Evidenciar os patotipos *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* enteroemorrágica (EHEC) por meio da pesquisa de genes de virulência pelas técnicas de PCR e hibridização de colônia;

3.2.3 Evidenciar os patotipos *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e amostras de *E. coli* com padrão *Chain-like adhesion* (CLA) pelo do teste de adesão em cultura de células Hep-2;

3.2.4 Estabelecer a frequência de cada patotipo de DEC nas regiões de saúde de Vitória por métodos genotípicos e fenotípicos;

3.2.5 Detectar a formação de biofilme em superfície abiótica e a formação de película na interface ar-líquido por amostras de EAEC e de CLA;

3.2.6 Descrever características genotípicas de virulência dos patotipos EAEC, aEPEC, DAEC e *E. coli* com padrão CLA.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo e amostra clínica

Trata-se de um estudo descritivo sobre prevalência e aspectos genotípicos e fenotípicos de patotipos diarreiogênicos de *E. coli*. Os patotipos de DEC foram identificados a partir de amostras fecais provenientes de indivíduos de todas as idades, com queixa de gastroenterite, no período de dezembro de 2007 a junho de 2011. Eles foram atendidos nas 28 Unidades Básicas de Saúde (UBS), nas duas Unidades de Pronto Atendimento (PA) e no Centro de Referência de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Síndrome da Imunodeficiência Humana (CR DST/AIDS), existentes nas seis regiões de saúde que pertencem ao município de Vitória-ES (Quadro 1).

Quadro 1 - Origem das amostras clínicas

Região de Saúde	Localização*	Bairro
Centro	UBS Vitória	Centro
	UBS Santa Teresa	Cabral
	UBS Avelina	Quadro
	UBS Fonte Grande	Fonte Grande
	UBS Ilha Do Príncipe	Ilha do Príncipe
	CR DST/AIDS	Centro
Continental	UBS Jabour	Jabour
	UBS Jardim Camburi	Jardim Camburi
	UBS Jardim da Penha	Jardim da Penha
	UBS Maria Ortiz	Maria Ortiz
	UBS República	Bairro República
Forte São João	UBS Praia Do Suá	Praia do Suá
	UBS Forte São João	Forte São João

	UBS Consolação	Gurigica
	UBS Ilha De Santa Maria	Ilha de Santa Maria
	UBS Jesus De Nazaré	Jesus de Nazaré
	PA Praia do Suá	Praia do Suá
Maruípe	UBS Andorinhas	Andorinhas
	UBS Thomaz Tommassi	Bonfim
	UBS Gilson Santos	Bairro da Penha
	UBS Maruípe	Maruípe
	UBS Santa Luíza	Santa Luíza
	UBS Santa Martha	Santa Martha
Santo Antônio	UBS Ariovaldo Favalessa	Caratoíra
	UBS Grande Vitória	Grande Vitória
	UBS Santo Antônio	Santa Tereza
São Pedro	UBS São Pedro V	Nova Palestina
	UBS Resistência	Resistência
	UBS Santo André	Santo André
	UBS Ilha das Caieiras	São Pedro
	PA São Pedro	São Pedro

*UBS - Unidade Básica de Saúde; CR - Centro de Referência; PA - Pronto Atendimento

(Prefeitura Municipal de Vitória, 2013)

Seguindo a rotina do Laboratório Central da Secretaria Municipal de Saúde (SEMUS) de Vitória-ES, as amostras fecais foram recolhidas diariamente das UBS, PA e CR e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da SEMUS, onde foram semeadas em meios de cultura de baixa e média seletividade, ágar MacConkey (MC) e ágar Hektoen (HK), respectivamente, e incubadas em estufa a 37°C por 16 a 24 horas. Colônias fermentadoras e não fermentadoras da lactose foram

identificadas pelo sistema automatizado VITEC®. Esse procedimento faz parte da rotina do Laboratório Central da SEMUS e o objetivo é identificar o agente etiológico bacteriano causador da gastroenterite.

Conforme solicitação médica, alguns espécimes também foram encaminhados a exames parasitológicos no Laboratório Central da SEMUS pelo método de Hoffman com adaptações introduzidas neste laboratório.

Após os procedimentos laboratoriais de rotina no Laboratório Central da SEMUS, as placas semeadas armazenadas em geladeira, foram recolhidas semanalmente e transportadas, seguindo normas estritas de biossegurança, ao Laboratório de Gastroenterite Infecciosa (LabGIn) no departamento de patologia da UFES, onde foi realizada a identificação da espécie *E. coli* por provas bioquímicas convencionais. Aproximadamente 90% das amostras recebidas pelo Laboratório Central da SEMUS foram processadas no LabGIn.

4.2 Identificação bioquímica

De cada placa recebida da SEMUS, com a semeadura direta das fezes, foram selecionadas cinco colônias fermentadoras da lactose (Lac+) e duas não fermentadoras (lac-), quando presentes. Em placas onde não havia colônias isoladas com características de *E. coli*, foi realizado um repique para uma placa de Agar MC pela técnica de esgotamento. A identificação da espécie *E. coli* foi realizada por meio dos testes fenotípicos descritos no Quadro 2.

4.3 Estoque das amostras

Cada amostra identificada como *E. coli* foi armazenada em duplicata, sendo uma em ágar nutriente inclinado a 8°C e outra em suspensão em sacarose (24%) a -20°C, para posterior caracterização fenotípica e genotípica.

Para realização de cada um dos testes descritos a seguir, as amostras armazenadas em sacarose a 24% ou em Agar Nutriente foram repicadas em ágar MC e incubadas a 37°C, por 16 a 24 horas.

Quadro 2 – Provas bioquímicas para identificação de *E. coli*

Meio de Cultura	Prova bioquímica	Fundamento bioquímico do teste	Positividade para *E. coli*
Caldo Vermelho de Metila Voges Proskauer (VMVP)	Via de fermentação da glicose	Caldo rico em glicose, para identificação da via de fermentação da glicose: ácida mista ou butileno-glicólica. Na via ácida mista ocorre a formação de ácidos que diminuem o pH do meio. A leitura é realizada após 48 a 72 horas de incubação, pingando-se o indicador vermelho de metila, que adquire coloração vermelha em pH < 4,4.	99%
MILi	Motilidade	Meio de cultura semissólido, o crescimento bacteriano além da linha de inoculação caracteriza a cepa como móvel.	95%
	Lisina	A enzima lisina descarboxilase atua na porção carboxila da lisina, presente no meio, com formação de aminas, que alcalinizam o meio. Em pH alcalino, o indicador púrpura de bromocresol confere coloração púrpura ao meio.	90%
	Indol	A enzima triptofanase degrada o triptofano, formando o gás indol, que forma um complexo vermelho com o reativo de Kovac's (paradimetilamino benzaldeido)	98%
Ágar Tríplice Sugar Iron (TSI)	Produção de gás carbônico	A fermentação da glicose produz ácido fórmico. Algumas bactérias degradam esse ácido formando gás carbônico, que é identificado pela presença de rachaduras no meio	95%
	Fermentação da glicose, lactose e/ou sacarose	O meio contém os açúcares glicose, lactose e sacarose nas proporções 1:10:10. Todas as enterobactérias fermentam a glicose, formando ácidos que deixam o meio amarelo. Na superfície aeróbia ocorre oxidação de peptonas com formação de aminas e alcalinização do meio, tornando-o vermelho na superfície e amarelo na parte anaeróbia. Cepas que fermentam também a lactose e/ou sacarose formam ácidos em grande quantidade e as aminas formadas na oxidação não são suficientes para virar o pH. O meio mantém-se totalmente amarelo.	Glicose: 100%; Lactose: 95%; Sacarose: 0%
	Produção de gás sulfídrico (H_2S)	Bactérias que apresentam a enzima tiossulfato redutase utilizam o enxofre do meio, produzindo H_2S, que forma um precipitado de cor negra com citrato férrico amoniacal presente no meio.	1%
Ágar Citrato de Simmons	Citratase	Nesse meio só crescem bactérias capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. Neste caso, fonte inorgânica de nitrogênio e enxofre serão utilizadas, produzindo compostos alcalinos e consequente viragem do indicador azul de bromotimol para azul, que em pH neutro se mantém verde	1%
Ágar Fenilalanina	Fenilalanina desaminase	A enzima fenilalanina desaminase realiza a desaminação oxidativa da fenilalanina gerando ácido fenilpirúvido, evidenciado pela formação de um complexo verde, após a adição de cloreto férrico ($FeCl_3$)	0%

Fonte: (KONEMAN, WINN, *et al.*, 2006) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008)

4.4 Identificação dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli*

4.4.1 PCR *multiplex* e *monoplex*

Ácido nucléico bacteriano foi extraído de uma colônia isolada em Agar MC suspensa em 50 µL de água MILi Q (Millipore Sistema Direct-Q®) estéril em microtubos de 0,5 mL (Axygen Quality®). O DNA foi extraído por lise térmica (fervura durante cinco minutos), depois centrifugado (Eppendorf® Centrifuge 5424) a 10.000xg por um minuto e o sobrenadante, contendo o DNA bacteriano, coletado e armazenado em alíquotas a -20ºC (ARANDA, FAGUNDES-NETO e SCALETSKY, 2004). Foi preparado também um *pool* contendo 2 µL de DNA extraído de cada um dos isolados de *E. coli* de um mesmo paciente. O DNA extraído foi utilizado nas PCR para detecção de marcadores moleculares das DEC e para caracterização genotípica de EAEC, DAEC, aEPEC e CLA.

O DNA extraído foi adicionado à mistura de reação contendo iniciadores para detecção de genes de virulência (marcadores moleculares) que caracterizam os patotipos de DEC (Quadro 3), conforme descrito por Aranda *et al*. (2004), com modificações introduzidas no LabGIn. O volume final de reação utilizado foi de 25 µL no caso de cepas isoladas ou de *pool* contendo duas ou três cepas do mesmo paciente, ou de 50 µL no caso de *pool* contendo quatro a seis cepas do mesmo paciente. Nos casos em que algum dos ensaios foi positivo a partir do *pool*, fez-se uma nova PCR com cada amostra separadamente para determinar qual(ais) amostra(s) correspondia(m) ao patotipo determinado.

As amostras de *E. coli* positivas para o gene *eae*, foram submetidas à PCR *monoplex* para pesquisa do gene *bfp*A, que caracteriza aEPEC e *multiplex* para pesquisa dos genes *stx1* e/ou *stx2*, que caracterizam EHEC. As cepas Lac- de *E. coli* foram submetidas à PCR *monoplex* para detecção do gene *ipaH*.

A amplificação do ácido nucléico bacteriano foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler® (Applied Biosystem) e os fragmentos obtidos foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,5% e coloração com brometo de etídio (10 mg/mL) em Sistema de Visualização e Processamento de Imagens MiniBispPro® (Bio América Inc.).

Quadro 3 – Patotipos diarreiogênicos de *E. coli* com seus respectivos genes de virulência, iniciadores, programas de amplificação e tamanhos de fragmentos obtidos após PCR *multiplex* e *monoplex**

Ensaio	Programa de amplificação	**Gene**	**Iniciadores (5'-3')**	**Frag. (pb)**	**Patotipo de DEC**
1	1x(50°C/2 min.), 1x(95°C/5 min.), 40x(95°C/40 seg.; 58°C/ 1min.; 72°C/2 min.), 1x(72/7 min.)	*eae*	CTGAACGGCGATTACGCGAA CCAGACGATACGATCCAG	917	aEPEC, tEPEC, EHEC
		*bfp*A	AATGCTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	tEPEC
		*aat**	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	EAEC
2	1x(50°C/2 min.), 1x(95°C/5 min.), 40x(95°C/45 seg.; 50°C/ 1min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)	*lt*	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATTCCCTGTT	450	ETEC
		st	ATTTTTMTTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	190	ETEC
		ipaH	GTTCCTTGACCGCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAG	600	EIEC
		*stx*1	ATAAATCECCATTCGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	EHEC, STEC
		*stx*2	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC STCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	EHEC, STEC

Fonte:(ARANDA, FAGUNDES-NETO e SCALETSKY, 2004); *previamente referido como CVD432

4.4.2 Hibridização de colônias

A hibridização de colônias (HC) com sonda radioativa marcada com ^{32}P para os genes alvos *daaC*, *aat* e *eae*, característicos de DAEC, EAEC e EPEC, respectivamente, foi realizada em isolados negativos para os genes pesquisados por PCR, na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) no Laboratório de Microbiologia da professora Dra. Isabel Cristina Afonso Scaletsky.

Para realização do ensaio, as amostras de *E. coli* foram repicadas para 3 mL de caldo triptose de soja (*Tryptic Soy Broth* – TSB), incubadas por 16 horas a 37°C, repicadas novamente como *colony blot* em ágar MC (50 cepas por placa) e incubadas por 16 horas a 37°C. As colônias foram transferidas para papel filtro Whatman® (n° 541) colocado sobre o crescimento bacteriano por 10 minutos. Em

seguida, o papel foi retirado da placa, identificado, tratado com as soluções de lise e desnaturação (Quadro 4), secos à 37°C e fixados em uma folha de papel espesso recobertos com papel transparente de cloreto de polivinila para posterior hibridização.

As sondas utilizadas foram obtidas em laboratório pela técnica de PCR que possibilitou a amplificação do DNA total de cepas protótipos (EAEC 042, EPEC E2342/69, DAEC 1845). Os segmentos de DNA foram marcados com [α-^{32}P]dCTP com um kit comercial de marcação Ready-To-GoTM® (Amersham Pharmacia Biotech). Para posterior remoção dos nucleotídeos não incorporados foi utilizada uma microcoluna de sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech).

Quadro 4 - Soluções de lise e desnaturação utilizadas no ensaio de hibridização de colônias na ordem cronológica em que foram utilizadas e tempo de incubação

Solução	**Tempo (minutos)**
SDS (Duodecil Sulfato de Sódio)	3
NaOH (0,5 M)/NaCl (1,5 M)	5
Tris-NaCl	5
Citrato de Sódio Salino	5

A hibridização foi conduzida utilizando um tampão (5X SSC/ 0,5% SDS/ 10 mM EDTA/ Solução de Denhardt 1X/ 100 µg de DNA de esperma de salmão/mL) que proporcionou condições de hibridização específicas. A hibridização dos *colony blots* foi realizada *overnight* a 65°C e depois foi realizada a lavagem com tampão SSC 0,1X/ SDS 0,1% a 65°C. Então os filtros foram expostos a um filme de raio X a -80°C *overnight* para sensibilização seguido por revelação do filme.

4.4.3. Teste de adesão a células HEp-2

Os testes de adesão foram realizados com células HEp-2 em presença de D-manose, de acordo com metodologia descrita previamente (SCALETSKY, SILVA e TRABULSI, 1984). As células foram crescidas em placas de cultura com 24 poços (TPP- Techno Plastic Products AG®) com lamínulas de vidro, sobre as quais 10^5 células HEp-2 foram crescidas em 1 mL de *Dulbecco Minimal Essential Medium* (DMEM) (Cultilab™) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab™). A placa foi

incubada em estufa com 5% de CO_2 a 37°C e o crescimento celular foi acompanhado diariamente até a formação de uma camada semi-confluente de células sobre a lamínula. Cada poço foi lavado três vezes com solução salina balanceada (BSS), para remover células mortas ou não aderidas e o meio de cultura foi trocado por DMEM (Cultilab™) enriquecido com 2% de SFB (Cultilab™) e 2% de D- manose (Amresco™).

Cinco colônias das amostras bacterianas crescidas em Agar MC a 37°C por 16 a 24 horas, foram inoculadas em 2 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Merck™) e incubado a 37°C por 16 a 24h. Um inoculo contendo de 10^7-10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) de *E. coli* crescida no caldo BHI (~20 µL) foi adicionado em cada poço da placa com crescimento semi-confluente. Em cada placa foram inoculadas 23 amostras de *E. coli*, sendo 20 amostras a serem testadas, três amostras controles (tEPEC E2348/69, EAEC 042 e DAEC 1845) e o último poço da placa não foi inoculado (controle branco). A placa foi incubada em estufa a 37°C por três horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido, as células lavadas por três vezes com PBS pH 7,2 (*Phosphate-Buffered Saline*). Em seguida células e bactérias aderidas foram fixadas na lamínula (1 mL de metanol PA por dez minutos), coradas com Giemsa por 30 minutos, seguido por lavagem do poço com água comum por três vezes para remover o excesso de corante. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia e examinadas em microscopia de luz 40X (Olympus BX-41) por dois leitores diferentes em momentos independentes. Amostras com padrões de aderência não característicos foram repetidas em um novo ensaio, com período de incubação de seis horas.

Após a leitura das lâminas de cultivo celular, as amostras com padrão de aderência agregativa, difusa ou em cadeia foram classificadas como EAEC, DAEC e CLA, respectivamente (NATARO, KAPER, *et al.*, 1987) (GIOPPO, ELIAS JR, *et al.*, 2000). Considerando que amostras com padrão CLA corresponderiam a uma variação do padrão AA, que estudo anterior em nosso laboratório não evidenciou genes característicos de EAEC nesses isolados e que há poucos dados na literatura a respeito de sua caracterização (GIOPPO, ELIAS JR, *et al.*, 2000) (LU, IYODA, *et al.*, 2006) (MONFARDINI, 2012), elas foram inseridas no presente estudo para serem analisadas genotípica e fenotipicamente.

4.5 Caracterização genotípica e fenotípica de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* e de amostras *chain-like adhesion*

Somente uma amostra de DEC identificada de cada indivíduo como EAEC (AA+), DAEC (DA+), tEPEC (*eae*+, *bfp*+, *stx*-), aEPEC (*eae*+, *bfp*-, *stx*-) ou como CLA, foi selecionada randomicamente para a caracterização genotípica e fenotípica, sendo excluídas da análise as demais amostras do mesmo paciente, exceto em casos de infecção mista.

4.5.1 Pesquisa de marcadores de virulência por PCR

Genes de virulência relacionados com produção de adesinas, proteínas de membrana externa, regulador transcripcional, toxinas, receptor heme e sideróforo foram pesquisados nos patotipos aEPEC, EAEC, DAEC e nos isolados CLA (Quadro 5). A amplificação do ácido nucléico bacteriano ocorreu em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler® (Applied Biosystem) com os iniciadores e programas de amplificação descritos nos Quadros 6 e 7. Os fragmentos obtidos foram visualizados conforme previamente descrito.

Quadro 5 – Genes de virulência pesquisados nos patotipos de DEC

Classificação	Gene	Patotipos			
		EAEC	DAEC	aEPEC	CLA
Adesinas	***afa***		X		
	aida/aah		X		
	daad		X		
	aggA	X			X
	aafA	X			X
	agg-3A	X			X
	Hda	X			
	fimA			X	
	efa1/ lifA			X	
	paa			X	
	nlE			X	
Proteínas de Membrana externa	***aap***	X			
	eibG				X
Regulador transcripcional	***aggR***	X			X
Toxinas	***hlyA/ehxA***		X	X	
	sat	X			
	pet	X	X	X	X
	set1A	X	X	X	X
	astA	X	X	X	X
Captadores de ferro (Receptor Heme/Sideróforos)	***chuA/shuA***	X		X	X
	iucA	X		X	X
	irp2	X		X	X

Quadro 6 – Descrição da PCR monoplex para detecção dos genes de virulência de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* (EAEC, DAEC, aEPEC ou CLA).

Gene	Descrição	Sequência (5' →3')	Tamanho fragmento (pb)	Condições de Amplificação	Referência
afa	Envolvida na aderência difusa	CGGCTTTTCTGCTGAACTGGCAGGC CCGTCAGCCCCCACGGCAGACC	672	1x(95°C/5 min); 25x(94°C/1 min; 65°C/1 min; 72°C/2 min); 1x(72°C/7min)	(LE BOUGUÉNEC, LALIOUI, *et al.*, 2001)
Aida/aah	Envolvida na aderência difusa/ seu promotor	TCGATACCGAAACGCATACGCAGA ACGCCGATCGGTGATGATGAAGAT		50°C/30 min, 95°C/15 min; 40x (94°C/15 seg.; 55°C/20 seg.; 72°C/ 30 seg) 1x(72°C/7min)	(BERTHIAUME, LEBLOND, *et al.*, 2010)
daad	Fímbria 1845, envolvida na aderência difusa	ACGGGAGTATAAGGAAGATGAT ATCCTTACTCTGCACCACATAG	245	1x(95°C/5 min); 30x (94ºC/1min, 56ºC/1min, 72ºC/1min); 1x(72°C/7min)	Desenhado pelo LabGIn
aggA	Subunidade da fímbria AAF/I	TTAGTCTTCTATCTAGGG AAATTAATTCCGGCATGG	450	1x(95°C/5 min); 30x(94°C/1 min; 46°C/1min; 72°C/1 min); 1x(72°C/7min)	(CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999), com modificações
aafA	Subunidade da fímbria AAF/II	ATGTATTTTTAGAGGTTGAC TATTATATTGTCACAAGCTC	518	1x(95°C/5 min); 30x(94°C/1 min.; 50°C/1min; 72°C/1 min); 1x(72°C/7min)	(CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999), com modificações
agg-3A	Subunidade da fímbria AAF/III	GTATCATTGCGAGTCTGGTATTCAG GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG	462	1x(95°C/5 min); 30x(94°C/1 min.; 65°C/1 min.; 72°C/1 min.); 1x(72°C/7min)	(BERNIER, GOUNON e LE BOUGUÉNEC, 2002)
hda	Subunidade da fímbria AAF/IV	TCCATTATGTCAGGCTGCAA GGCGTTAACGTCTGATTTCC	411	1x(94°C/2min); 35X (94°C/30seg; 59°C/1min; 72°C/1,5min); 1x(72°C/10min)	(BOISEN, STRUVE, *et al.*, 2008)
fimA	Subunidade da fímbria tipo I de *E. coli*	TGCTTTCCTCTATGAGTCAA GATACTGAACCTTGAAGGTC	693	1x(95°C/5 min); 33x (94°C/30seg, 58°C/ 30seg., 72°C/1 min); 1x(72°C/7min)	(TARTOF, SOLBERG e RILEY, 2007)
efa 1/lifA	Fator de aderência de EHEC (Efa1) similar ao inibidor da ativação de linfócitos (lifA)	AAGGTGTTACAGAGATTA TGAGGCGGCAGGATAGTT	268	1x(95°C/5 min); 30x(94°C/1 min.; 50°C/1min; 72°C/1 min); 1x(72°C/7min)	(NICHOLLS, GRANT e ROBINS-BROWNE, 2000)
paa	Marcador de lesão A/E em porcos	ATGAGGAACATAATGGCAGG TCTGGTCAGGTCGTCAATAC	357	1x(95°C/5 min); 30x(94°C/1min; 56°C/1mim; 72°C/1min); 1x(72°C/7min)	(BATISSON, GUIMOND, *et al.*, 2003)
nlE	Proteína efetora E	ATGATTAATCCTGTTACTAATACTCAG CTACTCAATTTTAGAAAGTTTATTATT TAT	675	1x(95°C/5 min); 30x(95°C/45seg; 58°C/1min; 72°C/1 min.); 1x(72°C/7min)	(MORABITO, TOZZOLI, *et al.*, 2003)

aap	Dispersina – proteina anti-agregação	CTTTTCTGGCATCTTGGGT GTAACAACCCCTTTGGAAGT	232	1x(95°C/5 min); 30x(94°C/1 min; 52°C/1min; 72°C/1min); 1x(72°C/7min)	(CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999)
eibG	Proteína ligadora de Imunoglobulina associada ao fenótipo CLA	ATCGGCTTTCATCGCATCAGGAC CCACAAGGCGGGTATTCGTATC	548	1x(94°C/2mim), 25x(94°C/45seg; 60°C/1 min; 72°C/1 mim), 1x(72°C/10min)	(LU, IYODA, *et al.*, 2006)
aggR	Regulador transcripcional de AAF/I, AAF/II e AAF/IV	CTAATTGTACAATCGATGTA ATGAAGTAATTCTTGAAT	308	1x(95°C/5 min); 30x(94°C/1 min; 42°C/1min; 72°C/1 min); 1 x (72°C/ 7 min)	(CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999)
hlyA/*ehxA*	α- hemolisina	CTCATTGGCCTCACCGAACGG GCTGGCAGCTGTGTCCACGAG	299	1x(95°C/5 min); 35x(94°C/30 seg; 57°C/30 seg; 72°C/1 min); 1x (72°C/ 7 min)	(GUIGNOT, BREARD, *et al.*, 2000)
sat	Toxina autotransportada	ACTGGCGGACTCATGCTG T AACCCTGTAAGAAGACTGAGC	387	1x(95°C/5 min); 30x(94°C/25seg.; 64°C/1 min; 72°C/2,5 min); 1x (72°C/ 7 min)	(RUIZ, NAVIA, *et al.*, 2002)
irp2	Quelante de ions férricos	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	264	1x(95°C/5 min); 30x(94°C/1 min; 55°C/1min; 72°C/1 min); 1x (72°C/ 7 min)	(CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999)

Quadro 7 – Descrição da PCR multiplex para detecção dos genes de virulência de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* (EAEC, DAEC, aEPEC ou CLA)

Gene	Descrição	Sequencia (5' →3')	Tamanho fragmento (pb)	Condições de Amplificação	Referência
astA	Toxina termo estável de EAEC (EAST 1)	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111	1x(95°C/5 min.); 30x(94°C/1min.; 55°C/1min.; 72°C/1min.); 1 x (72°C/ 7 min.).	(HUANG, MOHAMED, *et al.*, 2007) (MONFARDINI, 2012)
pet	Toxina (serina protease) codificada pelo plasmídio	GACCATGACCTATACCGACAGC CCGATTTCTCAAACTCAAGACC	600		
set1A	Mucinase/ Enterotoxina 1 *Shigella* (ShET1)	TCACGCTACCATCAAAGA TATCCCCCTTTGGTGGTA	309		
chuA	Receptor Heme	ATCTGCTGCGTCATGTTCCT GTAGTGGTCATACCTTTGAGC	1.7	1x(95°C/5 min.); 30x(94°C/30 seg.; 52°C/30seg.; 72°C/1,5min.); 1 x (72°C/ 7 min.).	(OKEKE, SCALETSKY, *et al.*, 2004) (MONFARDINI, 2012)
iucA	Sintetase para Aerobactina	AGTCTGCATCTTAACCTTCA CTCGTTATGATCGTTCAGAT	1.1		

4.5.2 Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica e de película por amostras de EAEC e CLA

Ensaio de capacidade de formação de biofilme foi realizado em amostras de EAEC e de CLA conforme descrito por Skeikh e colaboradores (2001). Duas colônias do crescimento bacteriano em ágar MC foram inoculadas em 2 mL de caldo LB (Luria Bertani). Após incubação com agitação a 37°C por 16 a 20 horas, foi preparada uma suspensão bacteriana correspondente à escala 0,5 de MacFarland ($1,5x10^8$ UFC/mL). Uma alíquota de 2 µL da suspensão bacteriana foi inoculada em triplicata em poços de microplacas de poliestireno com 96 poços, contendo 200 µL de DMEM (Cultilab™) suplementado com 0,4% de glicose. A placa foi então incubada por 16 a 20 horas a 37°C. As células bacterianas não aderidas foram removidas por meio de quatro lavagens com PBS (pH 7,2). A placa foi invertida em folhas de papel toalha para remover o excesso de água e os poços secos à temperatura ambiente (TA) por cerca de 20 minutos (SHEIKH, HICKS, *et al.*, 2001).

As bactérias aderentes foram coradas com adição de 200 µL de safranina em cada poço por 15 minutos. Após esse tempo, o corante foi descartado e os poços lavados por quatro vezes com água destilada por imersão. A placa foi novamente seca à TA por 1 hora e o corante incorporado nas bactérias foi solubilizado com adição de 100

µL de etanol 97% éter (v/v) em cada poço e em seguida, de 100 µL de PBS. A densidade ótica (DO) foi lida em leitor de ELISA Thermoplate TP Reader® utilizando o comprimento de onda (λ) de 490 nm.

Este teste foi repetido por mínimo por duas vezes em momentos diferentes. Em todos os ensaios foi utilizado um controle positivo (EAEC042) e dois controles negativos (*E. coli* HB101 e *E. coli* DH5α).

A média dos três valores da DO de cada cepa bacteriana testada foi calculada, sendo desconsiderados valores que divergiam em 20% da média das duas DOs mais próximas. A classificação da amostra bacteriana como “produtora” ou “não produtora” de biofilme foi realizada considerando a média (x) e o desvio padrão (DP) dos controles negativos testados. Amostras bacterianas que apresentaram uma DO superior à média mais três vezes o DP dos controles negativos testados na mesma placa ($xDO_{CN} + 3DP_{CN}$) foram consideradas “produtoras” de biofilme (STEPANOVIC, VUKOVIC, *et al.*, 2007).

No teste de formação de película ou *Clump*, cinco colônias das amostras de EAEC e de CLA, crescidas em ágar MC, foram inoculadas em 5 mL de caldo Mueller Hinton (MH), que foi incubado sob agitação a 37°C por 16 a 20 horas. A leitura foi realizada pela análise visual da formação de película na interface ar-líquido. Em cada ensaio foram utilizados três controles positivos (Q447E, Q001A, ambas amostras do LabGIn, e EAEC 042) para que houvesse um padrão de comparação de formação de halos em escore (respectivamente 1+, 2+, 3+) e um controle negativo (HB101).

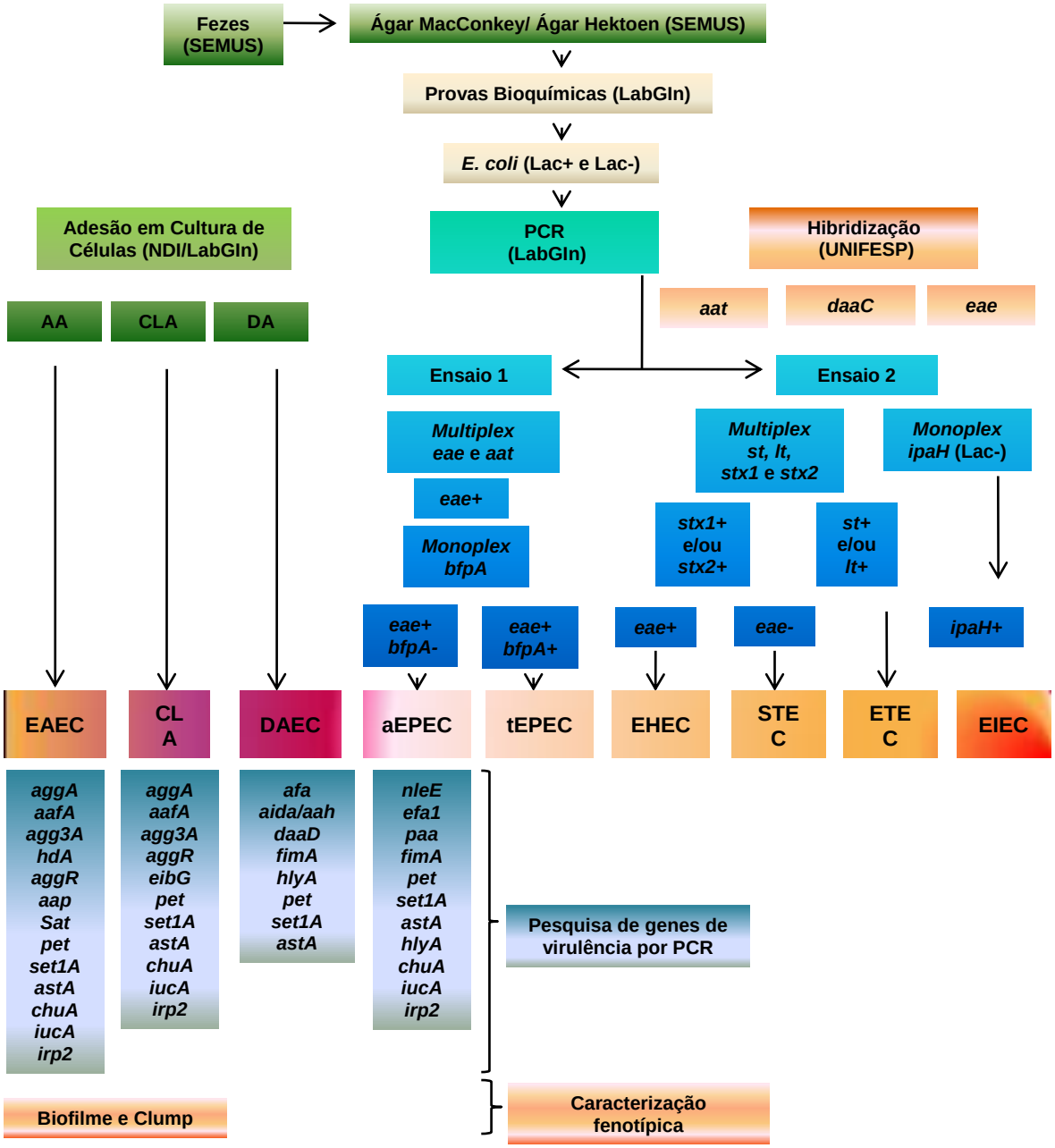
4.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram armazenados em um banco de dados criado no programa SPSS- *Data entry* (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0 e analisados com relação à frequência de variáveis categóricas. Todos os dados obtidos de pacientes foram computados e analisados de forma anônima.

4.7 Aspectos Éticos

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFES sob o número 089/07 em 31 de outubro de 2007 (Anexo I).

4.8 Fluxograma da metodologia



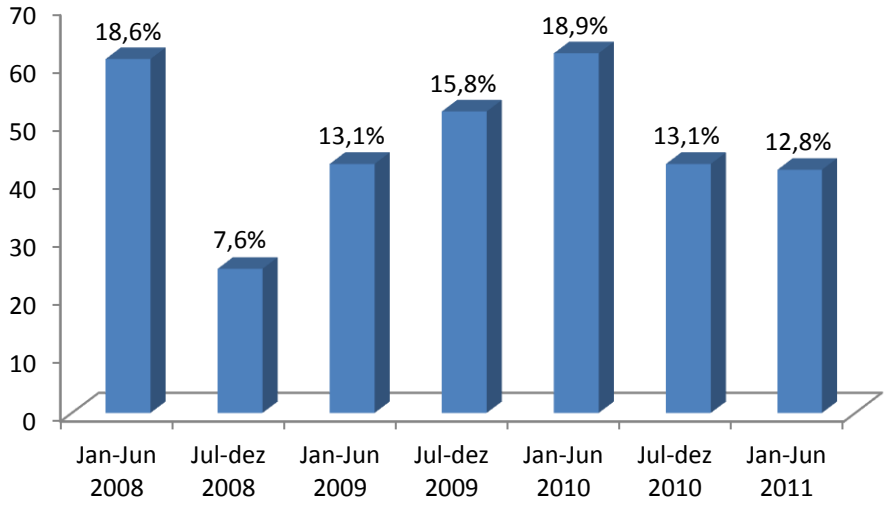
Fluxograma 1 – Representação esquemática da metodologia para identificação e caracterização fenotípica e genotípica dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli* e *Chain-Like Adhesion* (CLA)

5.RESULTADOS

5.1 Amostras e identificação bacteriana

Foram obtidas 328 amostras de fezes entre janeiro de 2008 e junho de 2011, das quais 26,2% (86/328) foram coletadas em 2008; 29% em 2009; 32% (105/328) em 2010 e; 12,8% (42/328) em 2011. No Gráfico 1 pode ser observada a distribuição semestral de coleta das amostras.

Gráfico 1 – Número de amostras bacterianas coletadas, distribuídas pelos semestres compreendidos entre os anos 2008 e 2011.



E. coli foi identificada por provas bioquímicas de 281 (85,7%) amostras, com um a seis isolados por amostra, totalizando 900 isolados. Colônias Lac+ e Lac- foram encontradas em 94% (264/281) e 13,5% (38/281) das amostras, respectivamente, e ambas, em 7,5% (21/281).

5.2 Detecção dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli*

Todos os 900 isolados de *E. coli* provenientes das 281 amostras positivas para esta espécie foram submetidos aos métodos genotípicos e fenotípicos para determinação do patotipo de DEC (itens 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3).

5.2.1 Marcadores moleculares

A pesquisa de genes de virulência que caracterizam os patotipos de DEC por PCR (Figura 5) e por HC nas 281 amostras com isolados de *E. coli*, resultou em: (i) 10

(3,6%) amostras com isolados de aEPEC (*eae*+, *bfpA*-, *stx1*-, *stx2*-), sendo nove *eae*+ por PCR e HC e uma *eae*+ por HC; (ii) 2 (0,6%) de ETEC (*st*+ e/ou *lt* +). De nenhuma amostra foi isolada tEPEC (*eae*+/*bfp*+), EIEC (*ipaH*+) ou EHEC/STEC (*eae*+/*stx1*+ e/ou *stx2*+).

O gene *aat* (Figura 5) e o plasmídio pAA (HC) foram encontrados, respectivamente, em 17 e em 25 amostras. A sonda *daaC* foi positiva em isolados de 35 amostras (dados não mostrados).

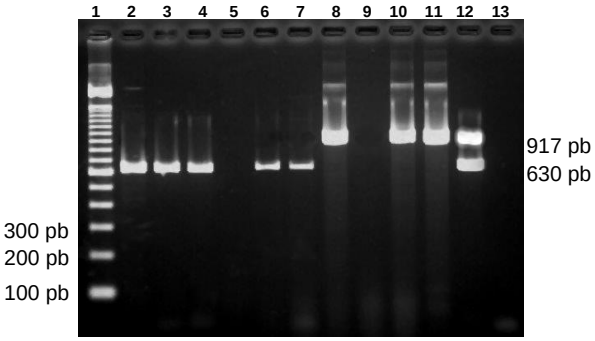


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio com produtos de amplificação obtidos em Ensaio 1 de PCR *multiplex* com iniciadores para os genes *eae* e *aat* (CVD432). Coluna 1: padrão de peso molecular 100 pb; Coluna 2-4, 6 e 7: amostras positivas para *aat* (630 pb); Colunas 5 e 9: amostras negativas; Colunas 8, 10 e 11: amostras positivas para *eae* (917 pb); Coluna 12: Controles positivos EPEC E2342/69 e EAEC 042; Coluna 13: Controle Negativo.

5.2.2 Teste de adesão em cultura de células

O teste de adesão em cultura de células HEp-2, realizado em pelo menos um isolado por amostra, resultou em: (i) 60 isolados com padrão AA, classificadas como EAEC; (ii) 42 com padrão DA, classificadas como DAEC e; (iii) 16 com padrão CLA (Figura 6). Os padrões LA e LAL não foram identificados neste estudo.

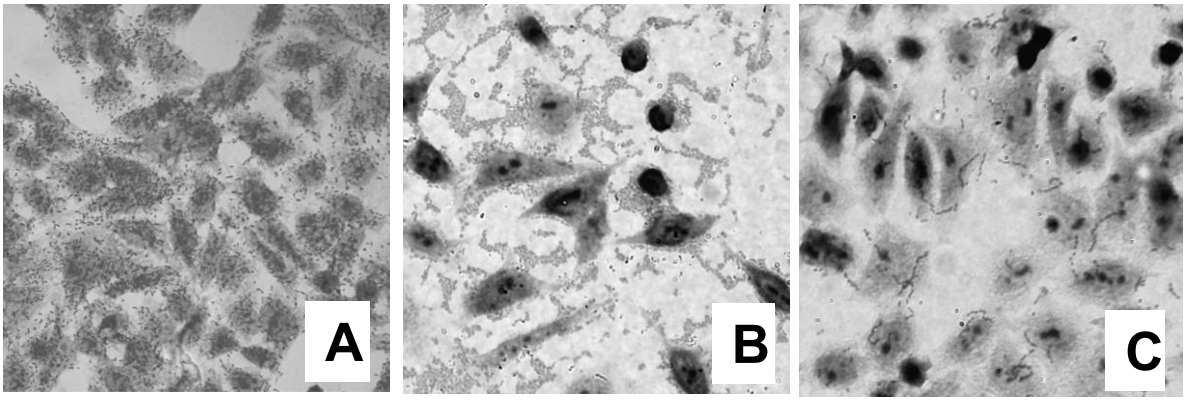


Figura 6 – Aderência em cultura de células Hep-2 após 3 horas de incubação, corado com *Giemsa*, visualização em aumento de 40X. A: Aderência Difusa (DA); B: Aderência Agregativa (AA); C: *Chain Like Adhesion* (CLA).

5.2.3 Relação entre marcadores genéticos e adesão em cultura de célula na identificação de *E. coli* enteroagregativa e de *E. coli* de aderência difusa

Das 60 amostras de EAEC identificadas pelo teste de adesão em cultura de células, 19 apresentaram o plasmídio pAA (pAA+) e 15, o gene *aat* (*aat*+) (Figura 7). Quatro amostras pAA+ e duas amostras pAA+ e *aat*+ não aderiram na cultura de células (Figura 7).

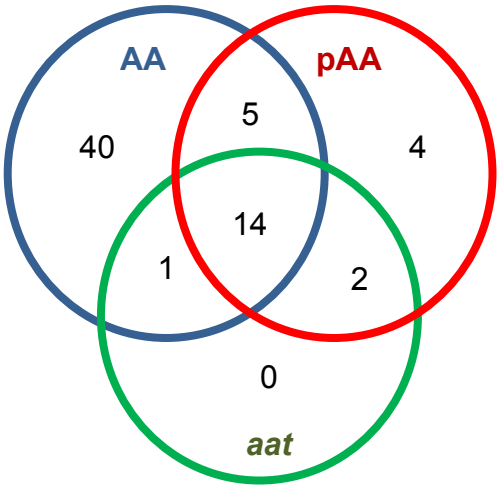


Figura 7 - Diagrama de Venn demonstrando a relação entre os testes realizados para pesquisa de EAEC, aderência agregativa (AA) em cultura de células HEp-2, detecção de *aat* por PCR e por hibridização (pAA).

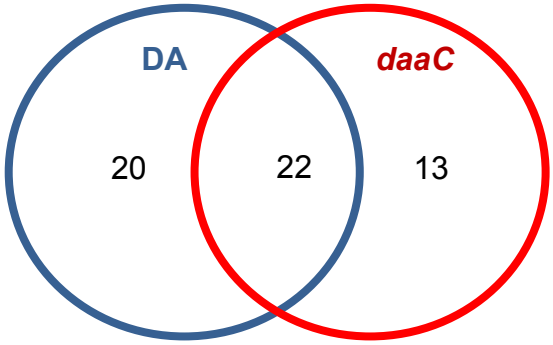


Figura 8 - Diagrama de Venn demonstrando a relação entre os testes realizados para pesquisa de DAEC, aderência aderência difusa (DA) em cultura de células HEp-2 e detecção de *daaC* por hibridização.

5.2.4 Frequência dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli*

Conforme a presença de marcadores de virulência e padrão de aderência em cultura de células, os patotipos de DEC foram identificados em 130 (46,3%) das 281 amostras analisadas, sendo 10 destas com infecção mista por dois patotipos diferentes (dados não mostrados). A distribuição dos patotipos de DEC isolados e a distribuição em faixas etárias podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição segundo as faixas etárias dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli* isolados de indivíduos de todas as idades atendidos nas Unidades de Saúde de Vitória, ES

Faixa etária (anos)	EAEC n (%)	DAEC n (%)	CLA n (%)	aEPEC n (%)	ETEC n (%)	Total DEC n (%)	Total *E. coli*	Total Amostras
0 – 5	24 (40)	15 (35,7)	0 (0)	5 (50)	0 (0)	44 (33,8)	96 (34,2)	113 (34,4)
5 – 20	4 (6,7)	5 (11,7)	6 (37,2)	4 (40)	0 (0)	19 (14,5)	34 (12)	40 (12,2)
> 20	32 (53,3)	22 (52,4)	10 (62,5)	1 (10)	2 (100)	67 (51,5)	151 (54)	175 (53,3)
Total	60	42	16	10	2	130 (46,3)	281 (85,7)	328

A distribuição dos patotipos de DEC encontrados em relação à Região de Saúde de procedência da amostra está representada na Figura 9. A Região de Saúde Continental apresentou maior frequência de DEC pelo total de amostras de *E. coli*

isoladas na região, com 54% (27/50) de DEC, enquanto a Região Maruípe apresentou menor frequência de DEC, com 35% (14/40).

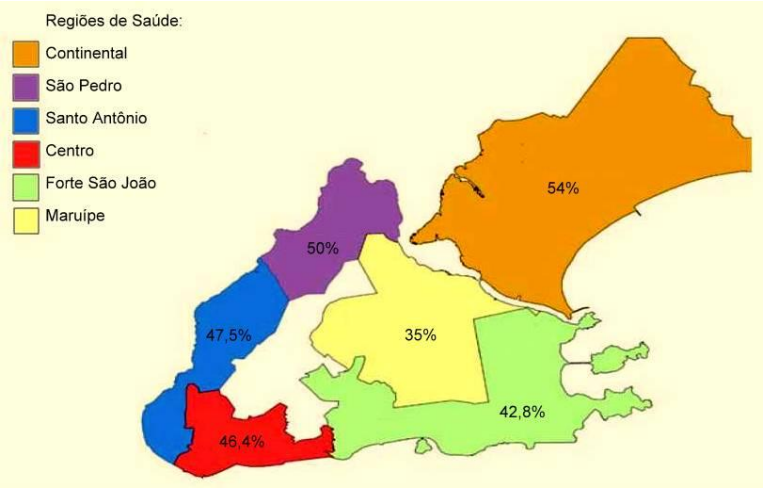


Figura 9 – Mapa do município de Vitória, dividido em Regiões de Saúde com porcentagem de DEC isoladas em relação ao número de amostras coletadas por região.

5.3 Caracterização dos isolados de *E. coli* enteroagregativa

Em casos de mais de uma amostra/paciente de EAEC positiva, apenas uma amostra/paciente foi selecionada randomicamente. Sendo assim, 60 isolados de EAEC (AA+) provenientes de 60 indivíduos foram analisados.

5.3.1 Determinação de genes de virulência por PCR

As 60 amostras de EAEC identificadas com padrão AA foram submetidas à pesquisa de 13 genes de virulência por PCR (*aggR*, *aggA*, *aafA*, *agg3A*, *hda*, *aap*, *sat*, *pet*, *set1A*, *astA*, *chuA*, *iucA* e *irp2*) cujas frequências estão apresentadas na Tabela 3. Conforme a presença do ativador transcripcional *AggR*, 31,7% e 68,3% dos isolados foram classificados como tEAEC e aEAEC, respectivamente. O plasmídio pAA (gene *aat*) e os gene *agg3A*, *hda*, *aap*, *sat*, *pet*, *set1A* e *iucA* foram significativamente mais encontrados entre os isolados de tEAEC quando comparados aos de aEAEC (Tabela 3). As tabelas 4 e 5 mostram o repertório de genes de virulência das amostras de tEAEC e aEAEC, ressaltando a maior presença de combinações de genes de virulência entre os isolados de tEAEC.

Tabela 3 - Presença de genes de virulência entre amostras de EAEC típicas e atípicas isoladas de indivíduos de todas as idades atendidos nas Unidades de Saúde de Vitória ES

Genes de virulência	tEAEC	aEAEC	Total	Valor de p
	N = 19	N = 41	N = 60	
	n (%)	n (%)	n (%)	
aggR	19 (100%)	0 (0%)	19 (31,7%)	0,000
pAA	15 (75%)	4 (10%)	19 (32%)	0,000
aat	14 (74%)	1 (2%)	15 (25%)	0,000
aggA	1 (5%)	0 (0%)	1 (2%)	0,139
aafA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	ND*
agg3A	7 (37%)	0 (0%)	7 (12%)	0,000
hdA	5 (26%)	0 (0%)	5 (8%)	0,001
aap	17 (89%)	4 (10%)	21 (35%)	0,000
sat	6 (32%)	3 (7%)	9 (15%)	0,014
pet	15 (75%)	11 (27%)	26 (27%)	0,000
set1A	13 (68%)	3 (7%)	15 (25%)	0,000
astA	5 (26%)	9 (22%)	14 (23%)	0,710
chuA	4 (21%)	8 (20%)	12 (20%)	0,890
iucA	9 (47%)	8 (20%)	17 (28%)	0,026
irp2	9 (47%)	13 (32%)	22 (37%)	0,242

ND* valor de p não determinado

Tabela 4 - Repertório de genes de virulência das 19 amostras de EAEC típicas

Número de amostras	Gene														
	aggR	*aat*	pAA	*aggA*	*aafA*	*Agg3A*	*hdA*	*aap*	*sat*	*pet*	*set1A*	*astA*	*chuA*	*iucA*	*Irp2*
1	■	■	■					■							
1	■							■		■					■
1	■	■				■		■		■	■			■	■
1	■											■	■		
2	■	■	■			■		■	■	■	■			■	■
1	■	■	■				■	■		■	■		■		
1	■	■	■	■		■		■	■	■	■	■	■	■	■
1	■	■	■	■		■		■	■	■	■			■	■
1	■	■	■									■	■		■
1	■	■	■					■		■	■				■
1	■	■	■				■	■		■				■	
1	■	■	■				■	■			■	■			■
1	■	■	■				■	■		■					
1	■	■	■				■	■		■	■				
1	■	■	■			■		■	■	■	■			■	
1	■		■					■		■	■			■	
1	■					■		■	■	■	■			■	
1	■		■			■		■		■	■	■			

Tabela 5 - Repertório de genes de virulência das 41 amostras de EAEC atípicas

Gene / Número de amostras	*aggR*	*aat*	pAA	*aggA*	*aafA*	*Agg3A*	*hdA*	*aap*	*sat*	*pet*	*set1A*	*astA*	*chuA*	*iucA*	*Irp2*
15															
1		■	■												■
3															■
1			■									■			■
1			■					■				■			
1			■					■					■		
1										■	■	■			■
1										■	■	■		■	
1								■		■		■			
2										■					■
1										■					
1										■			■		
3									■	■			■	■	■
1										■				■	
1														■	
1													■		
2													■	■	
2												■			
1												■			■
1								■				■			

5.3.2 Formação de biofilme

O ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica (Figura 10) revelou que 21,7% (13/60) dos isolados foram formadores de biofilme, sendo 47,4% (9/19) e 9,7% (4/41) entre os isolados de tEAEC e aEAEC, respectivamente (p=0,002). O plasmídio pAA (gene *aat*) e os genes *aggR*, *agg3A*, *aap*, *sat*, *pet* e *set1A* foram estatisticamente associados aos isolados formadores de biofilme (p<0,05); enquanto o gene *chuA* foi encontrado apenas em amostras não produtoras de biofilme (p=0,042) (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC formadoras e não formadoras de biofilme

Genes de virulência	**Biofilme +**	**Biofilme -**	**Total**	**Valor de p**
	N = 13	**N = 47**	**N = 60**	
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	
pAA	8 (61,5)	11 (23,4)	19 (31,7)	0,009
aat	7 (53,8)	8 (17)	15 (25)	0,007
aggA	1 (7,7)	0 (0)	1 (1,7)	0,055
aafA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND*
agg3A	6 (46,2)	1 (2)	7 (11,7)	0,000
hdA	1 (7,7)	4 (30,7)	5 (8,3)	0,925
aap	11 (84,6)	10 (21,3)	21 (35)	0,000
aggR	10 (77)	9 (19)	19 (31,7)	0,000
sat	5 (38,5)	4 (8,5)	9 (15)	0,007
pet	10 (77)	16 (34)	26 (43,3)	0,006
set1A	11 (84,6)	4 (8,5)	15 (25)	0,000
astA	5 (38,5)	9 (19)	14 (23,3)	0,147
chuA	0 (0)	12 (25,5)	12 (20)	0,042
iucA	7 (53,8)	10 (21,3)	17 (28,3)	0,21
irp2	7 (53,8)	15 (32)	22 (36,7)	0,146

ND* não determinado

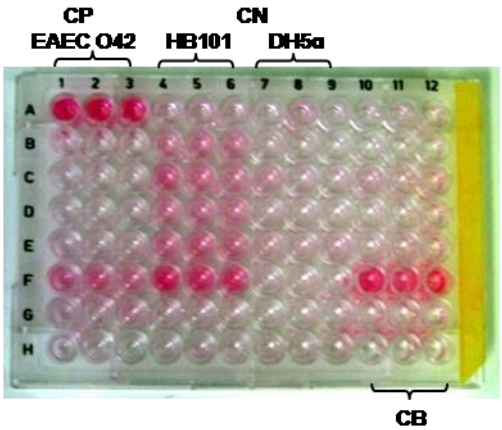


Figura 10 – Ensaio de capacidade de formação de biofilme de EAEC em placa de poliestireno com coloração por safranina. A intensidade da coloração é relacionada com a densidade óptica e com a formação de biofilme.

5.3.3 Análise da formação de película na interface ar-líquido

Foi observada formação de película por 90% (54/60) das EAEC distribuídos pelos escores 1+, 2+ e 3+ (Figura 11). Todos os isolados de tEAEC (19/19) e 85,3% (35/41) das aEAEC formaram película (Tabela 7). O escore ≥2+ foi significante entre as tEAEC (Tabela 7). O escore 3+ foi estatisticamente associado aos isolados formadores de biofilme (p=0,015).

Tabela 7 - Ensaio de formação de película (escore) nas amostras de EAEC típicas e atípicas

Película/ escore	tEAEC	aEAEC	Total	Valor de p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Negativo	0 (0)	6 (14,6)	6 (10)	0,079
1 +	4 (21)	23 (56)	27 (45)	0,011
≥2 +	15 (78,9)	12 (29,3)	27 (45)	0,001
Total	19 (100)	41 (100)	60 (100)	-

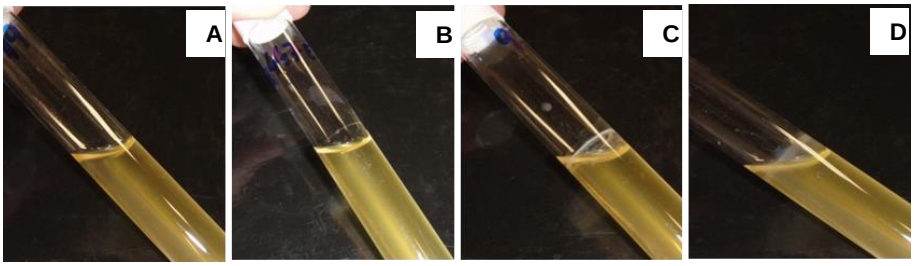


Figura 11 – Escores de formação de película na interface ar-líquido (controles). (A) Controle negativo (HB101); (B) 1+ (Q 447E*); (C) 2+ (Q 001A*); (D) 3+ (EAEC 042).
* Amostras de EAEC do LabGIn.

5.4 Caracterização dos isolados de *E. coli* com padrão CLA

Os resultados da pesquisa dos genes de virulência nos 16 isolados de *E. coli* apresentando o padrão CLA estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. Todos os isolados foram positivos para o gene *pet*; 14 (87,5%) formaram película na interface ar-líquido, 64,3% (9/14) com *score* ≥2+ e; nenhum foi capaz de formar biofilme.

Tabela 8 – Frequência dos genes de virulência pesquisados nos isolados de *E. coli* com padrão CLA

Genes	Total N = 16 n (%)
AggR	0 (0)
aggA	0 (0)
aafA	0 (0)
agg3A	0 (0)
eibG	2 (12,5)
pet	16 (100)
set1A	0 (0)
astA	3 (18,6)
Irp2	7 (43,6)
chuA	2 (12,5)
iucA	10 (62,5)

Tabela 9 - Repertório de genes de virulência nos 16 isolados de *E. coli* com padrão CLA

Gene / Número de amostras	*aggR*	*aat*/ pAA	*aggA*/ *aafA*/ *Agg3A*	*eibG*	*hlyA*	*Pet*	*set1A*	*astA*	*chuA*	*iucA*	*Irp2*
3						■					
1						■					■
3						■				■	
1				■		■					
1						■			■	■	
3						■				■	■
1						■		■		■	
1						■		■			■
1						■			■	■	■
1				■		■				■	■
1						■					

5.5 Caracterização dos isolados de *E. coli* de aderência difusa

Dos 42 isolados de DAEC (DA+), 52,4% (22/42) hibridizaram com a sonda *afaBC* (*afaBC* +). Todos os isolados *afaBC*+ também foram positivos para os genes *daad* e *afa*, encontrados em 59,5% (25/42) destes (Tabela 10). Os genes *hlyA* e *aida*/*aah* não foram encontrados em nenhuma das amostras de DAEC analisadas (Tabela 10). O repertório de genes de virulência com combinações apresentado pelos isolados de DAEC analisados está descrito na Tabela 11.

Excluindo-se os genes que classificam as DAEC como Afa/Dr e não Afa/Dr (*afa*, *daad*) e considerando os demais pesquisados, foi observado que 64% e 23,5% das DAEC Afa/Dr e não Afa/Dr apresentaram pelo menos dois genes, respectivamente.

Tabela 10 - Presença de genes de virulência entre amostras de DAEC afa/Dr + e afa/Dr-

Genes de virulência	**Afa/Dr +**	**Afa/Dr -**	**Total**	**Valor de p**
	N = 25	**N = 17**	**N = 42**	
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	
aida/aah	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND*
fimA	23 (92)	12 (70,6)	35 (83,3)	0,099
set1A	1 (4)	2 (11,7)	3 (7)	0,556
pet	17 (68)	6 (35,3)	23 (58,8)	0,059
astA	1 (4)	5 (29,4)	6 (14,3)	0,032
hlyA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND*

Tabela 11 - Repertório de genes de virulência entre os 42 isolados de DAEC

Gene	*afa*	*daaD*	*aida/aah*	*fimA*	*hlyA*	*pet*	*set1A*	*astA*
Número de amostras								
1	■	■		■		■	■	
1	■	■		■		■		■
14	■	■		■		■		
7	■	■		■				
1	■	■				■		
1	■	■						
1				■		■	■	
1				■			■	■
1				■				■
4				■		■		
1						■		
5				■				
3								■
1								

5.6 Caracterização dos isolados de *E. coli* enteropatogênica atípica

As 10 amostras de aEPEC foram genotipicamente caracterizadas através da pesquisa por PCR de 12 genes de virulência (*fimA*, *efa1*/*lifA*, *paa*, *nleE*, *sen*, *hlyA*, *pet*, *set1A*, *astA*, *chuA*, *iucA* e *irp2*) (Tabelas 12 e 13). Dentre os genes pesquisados, cinco não foram evidenciados em nenhum dos isolados (*irp2*, *set1A*, *astA*, *sen* e *hlyA*) (Tabela 12).

Tabela 12- Frequência dos genes de virulência pesquisados entre os isolados de aEPEC

Genes	Total N = 10 n (%)
fimA	9 (90)
efa1/lifA	3 (30)
paa	4 (40)
nlE	4 (40)
hlyA	0 (0)
pet	1 (10)
set1A	0 (0)
astA	0 (0)
chuA	2 (20)
iucA	1 (10)
irp2	0 (0)

Tabela 13- Repertório de genes de virulência entre os 10 isolados de aEPEC

Gene / Número de amostras	*eae*	*bfpA*	*nleE*	*paa*	efa1/lifA	*fimA*	*hlyA*	*pet*	*set1A*	*astA*	*chuA*	*iucA*	*Irp2*
4	■												
1	■			■									
1	■							■					
1	■		■										
1	■		■	■	■								
1	■		■	■	■						■		
1	■		■	■	■						■	■	

6. DISCUSSÃO

A diarreia atinge indivíduos de todas as idades sendo importante causa de afastamento do trabalho na população economicamente ativa. O presente estudo determinou a prevalência dos patotipos de DEC em amostras de *E. coli* isoladas de indivíduos de todas as idades com queixa de diarreia, atendidos nas UBS de Vitória - ES. Entretanto, como a diarreia é uma doença autolimitada, apenas uma parcela da população atingida procura atendimento médico. Além disso, não há universalidade no atendimento dos pacientes com diarreia nas UBS, nem todos os casos são encaminhados para coprocultura ou exame parasitológico de fezes. Estudos prévios realizados no Brasil com adultos foram restritos a EAEC e DAEC (PIVA, PEREIRA, *et al.*, 2003; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA e GIUGLIANO, 2013). Do nosso conhecimento esse é, portanto, o primeiro estudo realizado no Brasil que pesquisa a frequência de todos os patotipos de DEC em indivíduos de todas as idades.

6.1 *E. coli* e patotipos diarreiogênicos

A taxa de isolamento de *E. coli* (85,7%) nas amostras de fezes obtidas de indivíduos de todas as idades corrobora estudos prévios, que relataram frequências variando entre 81,7% - 90,5% (RODRIGUES, ACOSTA, *et al.*, 2002; FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; LOZER, 2011). Da mesma forma, a frequência dos patotipos de DEC (46,3%) dentre as amostras em que *E. coli* foi isolada se encontra na média da detecção no Brasil, com frequências variando entre 16,2%-78% como causa de diarreia infantil (FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002b; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002c; SOUZA, MARTINEZ, *et al.*, 2002; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; BUERIS, SIRCILI, *et al.*, 2007; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008; MORENO, FILHO, *et al.*, 2010; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013). Estudos realizados em outros países (Estados Unidos, Colômbia, Dakar, Índia e Iran) em indivíduos de todas as idades com diarreia, descrevem frequência de DEC variando entre 9,4%-56% (SVENUNGSSON, LAGERGREN, *et al.*, 2000; GASSAMA-SOW, SOW, *et al.*, 2004; NATARO, MAI, *et al.*, 2006; SAMAL, KHUNTIA, *et al.*, 2008; RÚGELES, BAI, *et al.*, 2010; SHETTY, KUMAR, *et al.*, 2012; ALIKHANI, HASHEMI, *et al.*, 2013). Destes, o estudo que relatou a menor frequência de DEC (9,4%) foi realizado nos Estados Unidos, o que era de se esperar por se

tratar de um país desenvolvido, onde menores taxas de infecção bacteriana intestinal são encontrados (NATARO, MAI, *et al.*, 2006).

Os patotipos de DEC estavam distribuídos homogeneamente pelas Regiões de Saúde do município de Vitória. Porém uma pequena diferença na taxa de DEC foi observada, sendo a Região Continental, que abriga os bairros mais nobres da cidade e, portanto, melhores condições de higiene esperadas, com uma maior frequência. Deve ser levado em conta que outros agentes bacterianos (*Campylobacter, Yersinia, Plesiomonas, Aeromonas*) não pesquisados neste estudo, assim como vírus e parasitos, poderiam também estar associados aos quadros de gastroenterite.

O patotipo de DEC mais comumente isolado no presente estudo, a EAEC (21%), tem sido relatada em frequência crescente no Brasil, como principal patotipo isolado, em frequências variando entre 2,6%-36% quando considerado crianças menores de cinco anos em estudos realizados no Rio de Janeiro, Salvador e Vitória utilizando técnicas de biologia molecular para detecção (FANG, LIMA, *et al.*, 1995; SOUZA, MARTINEZ, *et al.*, 2002; REGUA-MANGIA, GOMES, *et al.*, 2004; FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; BUERIS, SIRCILI, *et al.*, 2007; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008). Estudos que utilizaram aderência em cultura de células para avaliar a frequência de EAEC no Brasil em menores de cinco anos revelam frequências variando entre 20%-36,6% (SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002b; RODRIGUES, ACOSTA, *et al.*, 2002; RODRIGUES, THOMAZINI, *et al.*, 2004; FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; MORENO, FILHO, *et al.*, 2010). Do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que determina a frequência de EAEC em indivíduos de todas as idades no Brasil. Estudos realizados em outros países (Índia, Iran, Estados Unidos, Suécia) revelaram frequência de EAEC entre 1,9%-25%, sendo que, em países desenvolvidos, EAEC está entre as principais causas da diarreia do viajante causando diarreia em turistas que viajam para áreas menos desenvolvidas (SVENUNGSSON, LAGERGREN, *et al.*, 2000; NATARO, MAI, *et al.*, 2006; SAMAL, KHUNTIA, *et al.*, 2008; SHETTY, KUMAR, *et al.*, 2012; ALIKHANI, HASHEMI, *et al.*, 2013). Em estudo conduzido na África, EAEC foi identificada como único patógeno em 42,5% de pacientes HIV+ com diarreia persistente (GERMANI, MINSSART, *et al.*, 1998). Esses estudos apontam para emergência de EAEC como

causa de diarreia em crianças e adultos em países em desenvolvimento e desenvolvidos, principalmente tEAEC (*aggR*+) que apresenta um maior repertório de características genotípicas e fenotípicas de virulência (ELIAS, UBER, *et al.*, 2002; HUANG, MOHAMED, *et al.*, 2007; CENNIMO, ABBAS, *et al.*, 2009).

DAEC foi o segundo patotipo encontrado em maior frequência (14,9%). Estudos realizados no Brasil relatam frequência de DAEC variando entre 3,2%-35,9% em crianças menores de cinco anos (RODRIGUES, ACOSTA, *et al.*, 2002; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002b; SOUZA, MARTINEZ, *et al.*, 2002; RODRIGUES, THOMAZINI, *et al.*, 2004; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008), enquanto em outros países, a frequência é de até 4,8% (OCHOA, ECKER, *et al.*, 2009; RAJENDRAN, AJJAMPUR, *et al.*, 2010; OCHOA, MERCADO, *et al.*, 2011). Estes dados mostram de um modo geral, que maiores frequências de DAEC são encontradas no Brasil em crianças ou em adultos (presente estudo).

Os isolados de DAEC Afa/Dr+ apresentaram maior número de genes em relação às não Afa/Dr, o que está de acordo com a literatura, que descreve um maior repertório de genes de virulência e maior potencial de patogenicidade dessas para causar gastroenterite (GERMANI, BÉGAUD, *et al.*, 1996; LE BOUGUENEC e SERVIN, 2006; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA e GIUGLIANO, 2013). Isto sugere que uma sub-população mais patogênica, que seria constituída por aquelas com maior número de genes de virulência.

Estudos de caso controle apontam a DAEC como causa de diarreia dependente da idade, em crianças >12meses, em <24 meses ou entre 2-5 anos, realizados no Brasil ou em <12 meses, realizado no Peru (SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008; OCHOA, ECKER, *et al.*, 2009; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013). Entretanto, trata-se de um patotipo cuja participação na gênese da diarreia é discutida, trabalhos têm demonstrado DAEC no trato gastrointestinal de crianças com e sem diarreia, sugerindo que este patotipo possa fazer parte da microbiota intestinal de muitos indivíduos (ROSA, MARIANO, *et al.*, 1998; SOUZA, MARTINEZ, *et al.*, 2002; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002b; RODRIGUES, THOMAZINI, *et al.*, 2004; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007). Estudos que pesquisam DAEC em adultos são raros, entretanto recente estudo

realizado no Brasil associou DAEC afa/Dr+ à diarreia em adultos (MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA e GIUGLIANO, 2013).

O método utilizado neste estudo para detecção de EAEC e DAEC, teste de adesão em cultura de células, é considerado padrão-ouro para detecção destes patotipos (BILGE, CLAUSEN, *et al.*, 1989; NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005). Porém, métodos moleculares foram desenvolvidos para identificação da EAEC e DAEC por PCR e HC (BAUDRY, SAVARINO, *et al.*, 1990; GERMANI, BÉGAUD, *et al.*, 1996; NATARO e KAPER, 1998; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002a; SOUZA, MARTINEZ, *et al.*, 2002; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; HUANG, NATARO, *et al.*, 2006; RAJENDRAN, AJJAMPUR, *et al.*, 2010), o que permite avaliar a capacidade deles de detectar esses patotipos e ver sua aplicabilidade nos isolados da nossa área geográfica. Trata-se de uma informação importante, pois a metodologia de cultura de células é trabalhosa, demanda mão de obra qualificada e instalações laboratoriais adequadas e a PCR serviria como alternativa para discriminar esses patotipos de DEC em laboratório de análises clínicas.

A presença do plasmídio pAA/gene *aat* (previamente denominado CVD432) foram avaliados, por PCR e HC, entre os isolados de *E. coli*, por se tratarem de marcadores genéticos amplamente utilizados para *screening* de EAEC em muitos estudos (BAUDRY, SAVARINO, *et al.*, 1990; OKEKE, OLADIPUPO, *et al.*, 2003; PIVA, PEREIRA, *et al.*, 2003; WEINTRAUB, 2007; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013; SOUZA, LOZER, *et al.*, 2013). Ambos os métodos apresentaram baixa sensibilidade (25% e 31,7%, respectivamente) e alta especificidade (97% e 90%, respectivamente) para detecção de EAEC, destacando a importância do método fenotípico para a detecção da EAEC no município de Vitória, ES. Outros estudos descrevem a sensibilidade para detecção do plasmídio variando entre 15% a 90% dependendo da área geográfica pesquisada (FARUQUE, HAIDER, *et al.*, 1992; FANG, LIMA, *et al.*, 1995; GIOPPO, ELIAS JR, *et al.*, 2000; OKEKE, LAMIKANRA, *et al.*, 2000; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002a).

Da mesma forma, a pesquisa do gene *daaC*, relacionado à família de adesinas afimbriais Afa/Dr, vem sendo amplamente utilizada para *screening* de DAEC em estudos epidemiológicos (JALLAT, LIVRELLI, *et al.*, 1993; FANG, LIMA, *et al.*, 1995;

CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013; SOUZA, LOZER, *et al.*, 2013). Neste estudo, o gene *daaC* foi pesquisado por HC e apresentou sensibilidade também limitada (52,4%) e alta especificidade (94,6%) para detecção de DAEC. Estudo prévio realizado em nosso laboratório com isolados de DAEC provenientes de crianças quilombolas do norte do Espírito Santo mostrou sensibilidade e especificidade similares com a mesma sonda, 49,3% e 98,4%, respectivamente (LOZER, 2011). Quando testada em amostras de DAEC isoladas de diferentes regiões do Brasil, esta sonda apresentou sensibilidade de 64,3% e especificidade de 95,7% (SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002a; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002b; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002c). Kaper e colaboradores (2004) descreveram sensibilidade de 75% para detecção da DAEC com o uso da mesma sonda. Isto mostra que diferenças entre os isolados de variadas localizações geográficas comprometem o uso da sonda *daaC* como marcador genético na detecção de DAEC.

O patotipo aEPEC descrito como importante patógeno associado à gastroenterite em indivíduos de todas as idades, principalmente em crianças (NGUYEN, TAYLOR, *et al.*, 2006; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; BIELASZEWSKA, MIDDENDORF, *et al.*, 2008; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009; ALIKHANI, HASHEMI, *et al.*, 2013) foi identificado em baixa frequência (3,5%), mas similar à descrita em estudos prévios realizados no Brasil, que variam entre 2,8-10,3% em menores de cinco anos (SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002b; SOUZA, MARTINEZ, *et al.*, 2002; REGUA-MANGIA, GOMES, *et al.*, 2004; RODRIGUES, THOMAZINI, *et al.*, 2004; FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008; MORENO, FILHO, *et al.*, 2010; GARCIA, SILVA e DINIZ, 2011; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013). A aEPEC vem sendo relatada como um importante enteropatógeno associado à gastroenterite no Brasil e em outros países, como Austrália, Romênia, Nicarágua, Índia e Iran, em frequência variando entre 5,4%-47,5% (FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; NGUYEN, TAYLOR, *et al.*, 2006; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; BUERIS, SIRCILI, *et al.*, 2007; SAMAL, KHUNTIA, *et al.*, 2008; USEIN, CHITOIU, *et al.*, 2009; VILCHEZ, REYES, *et al.*, 2009; MORENO, FILHO, *et al.*, 2010; RAJENDRAN, AJJAMPUR, *et al.*, 2010;

GARCIA, SILVA e DINIZ, 2011; SHETTY, KUMAR, *et al.*, 2012; ALIKHANI, HASHEMI, *et al.*, 2013; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013).

O patotipo tEPEC, no passado descrito como um dos enteropatógenos bacterianos mais associados à diarreia infantil em lactentes no Brasil e em países em desenvolvimento (NATARO e KAPER, 1998; TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002) não foi identificado neste estudo. Este resultado poderia ser devido ao fato de apenas 15,5% das amostras analisadas neste estudo serem provenientes de crianças <1 ano. Por outro lado, ele confirma a frequência decrescente de tEPEC na população brasileira e mundial, relatada em estudos prévios variando de 0%-1,7% (NATARO e KAPER, 1998; RODRIGUES, ACOSTA, *et al.*, 2002; RODRIGUES, THOMAZINI, *et al.*, 2004; FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; NATARO, MAI, *et al.*, 2006; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; BUERIS, SIRCILI, *et al.*, 2007; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008; MORENO, FILHO, *et al.*, 2010; SHETTY, KUMAR, *et al.*, 2012; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013).

No presente estudo, a ETEC foi isolada em baixa frequência (0,6%), e somente em indivíduos adultos, nenhum isolado, portanto em <5 anos, refletindo a baixa frequência de ETEC no sudeste brasileiro, já demonstrado em estudos prévios com menores de cinco anos, que revelam frequência de ETEC entre 1,2%-3,5% (SOUZA, MARTINEZ, *et al.*, 2002; REGUA-MANGIA, GOMES, *et al.*, 2004; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008). No nordeste do Brasil, a prevalência de ETEC variou de 3,7%-7,5% em crianças com diarreia (FANG, LIMA, *et al.*, 1995; FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; BUERIS, SIRCILI, *et al.*, 2007). Uma frequência de 6,5% em <5 anos também foi observada no norte do Espírito Santo em estudo com crianças que vivem em área semi-rural sem saneamento básico (LOZER, SOUZA, *et al*., 2013). Esses resultados podem ser explicados pelas boas condições de saneamento básico existentes na região sudeste. Em países ou áreas geográficas com precárias condições de saneamento, como Índia, Nicarágua e Iran, a frequência de ETEC é alta, variando entre 17,5%-52,7% em indivíduos de todas as idades (SAMAL, KHUNTIA, *et al.*, 2008; VILCHEZ, REYES, *et al.*, 2009; ALIKHANI, HASHEMI, *et al.*, 2013). Nessas regiões, a ETEC é endêmica, e a desidratação por ETEC corresponde principal causa de mortalidade por diarreia em <5 anos (QADRI, SVENNERHOLM, *et al.*, 2005; TURNER, SCOTT-TUCKER, *et al.*, 2006; SHAH, DUPONT e RAMSEY, 2009).

EIEC e EHEC/STEC não foram identificados neste estudo, confirmando a baixa frequência desses patotipos na população brasileira, que tem variado de 0%-0,9% em <5 anos (RODRIGUES, ACOSTA, *et al.*, 2002; NUNES, SARIDAKIS, *et al.*, 2003; REGUA-MANGIA, GOMES, *et al.*, 2004; RODRIGUES, THOMAZINI, *et al.*, 2004; FRANZOLIN, ALVES, *et al.*, 2005; BUERIS, SIRCILI, *et al.*, 2007; SPANO, SADOVSKY, *et al.*, 2008; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013). A baixa frequência de EIEC é relatada em outras regiões do mundo, enquanto que EHEC e STEC são importantes causas de surtos em países desenvolvidos, no continente europeu e nos Estados Unidos (NATARO e KAPER, 1998; PATON e PATON, 1998; EPPINGERA, MAMMELC, *et al.*, 2011; SHETTY, KUMAR, *et al.*, 2012; ALIKHANI, HASHEMI, *et al.*, 2013). Recente estudo conduzido no Iran demonstrou STEC como responsável por 17% dos casos de gastroenterite em adolescentes e adultos (ALIKHANI, HASHEMI, *et al.*, 2013).

6.2 Caracterização genotípica e fenotípica de patotipos diarreiogênicos de *E. coli* e de *E. coli* com padrão CLA

Dentre as DEC existe uma grande diversidade de genes possíveis de virulência, sendo que genes de um patotipo podem ser transferidos para outro patotipo (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Devido à maior frequência em que a EAEC, DAEC e aEPEC foram encontradas neste estudo, e pela heterogeneidade descrita de seus isolados, em especial de EAEC e DAEC, estes patotipos e também a *E. coli* com padrão CLA foram caracterizados através da pesquisa de genes de virulência por PCR. Ainda, tanto a EAEC como a *E. coli* com padrão CLA foram testadas quanto à capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica e de película na interface ar-líquido.

6.2.1 *E. coli* enteroagregativa

O gene *aggR*, sugerido marcador de EAEC verdadeiramente virulenta e descrito inicialmente no plasmídio pAA1 (NATARO, DENG, *et al.*, 1994), foi observado em aproximadamente um terço dos isolados de EAEC, classificadas então como tEAEC. Estudos prévios relatam frequência de tEAEC variando entre 7%-100% dependendo da área geográfica de origem da amostra e da técnica utilizada para detecção de EAEC (OKEKE, LAMIKANRA, *et al.*, 2000; KAHALI, SARKAR, *et al.*, 2004;

SARANTUYA, NISHI, *et al.*, 2004; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; MOYO, MASELLE, *et al.*, 2007; HUANG, MOHAMED, *et al.*, 2007; BOISEN, SCHEUTZ, *et al.*, 2012; LIMA, BOISEN, *et al.*, 2013). Vale ressaltar que os isolados de tEAEC são estatisticamente mais associados à diarreia do que os isolados de aEAEC em estudos do tipo caso controle (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; SARANTUYA, NISHI, *et al.*, 2004; ZAMBONI, FABBRICOTTI, *et al.*, 2004; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007).

Ressaltando o potencial patogênico das tEAEC, a produção de biofilme e de película foi significante entre estas nas amostras do presente estudo ($p<0,05$). A capacidade de produção de biofilme é uma característica importante na patogênese da EAEC, pois está também associada à maior duração da diarreia e colonização persistente, inclusive em carreadores assintomáticos que servem como reservatório, além de conferir proteção contra ação de antimicrobianos (WAKIMOTO, NISHI, *et al.*, 2004; DONLAN e COSTERTON, 2002; MOHAMED, HUANG, *et al.*, 2007; MENDEZ-ARANCIBIA, VARGAS, *et al.*, 2008; FLEMMING e WINGENDER, 2010; MENDEZ-ARANCIBIA, VARGAS, *et al.*, 2008; BOLICK, ROCHE, *et al.*, 2013).

Além disso, a caracterização genotípica revelou maior frequência dos genes de virulência (dispersina, toxinas, adesinas e captadores de ferro) ($p<0,05$) entre os isolados de tEAEC, corroborando estudos prévios que relatam maior frequência entre os isolados de tEAEC (PIVA, PEREIRA, *et al.*, 2003; HUANG, MOHAMED, *et al.*, 2007; PEREIRA, FERRAZ, *et al.*, 2007; CENNIMO, ABBAS, *et al.*, 2009; BOISEN, SCHEUTZ, *et al.*, 2012;LIMA, BOISEN, *et al.*, 2013; MONFARDINI, 2012). Esta informação é importante visto que o isolamento da EAEC de indivíduos com diarreia simplesmente não garante a associação clínica (HUANG, NATARO, *et al.*, 2006) e os resultados do presente estudo apontam, portanto, para a tEAEC como causa da gastroenterite nos indivíduos de todas as idades.

Em conformidade com estudos prévios, entre os isolados de tEAEC, os genes plasmidiais (*aat*, *aap*, *pet, agg3A* e *hdA*) foram encontrados em maior frequência que os cromossômicos (*set1A*, *irp2* e *iucA*) ($p<0,05$) (CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999; OKEKE, LAMIKANRA, *et al.*, 2000; BOUZARI, JAFARI, *et al.*, 2001; SUZART, GUTH, *et al.*, 2001; SUZART, GUTH, *et al.*, 2001; ELIAS, UBER, *et al.*, 2002;

ZAMBONI, FABBRICOTTI, *et al.*, 2004; REGUA-MANGIA, GOMES, *et al.*, 2004; HUANG, MOHAMED, *et al.*, 2007; MONFARDINI, 2012).

Considerando os genes captadores de ferro (*irp2*, *iucA* e *chuA*) todos foram encontrados em maior frequência entre os isolados de tEAEC, porém o único estatisticamente significativo foi *iucA* ($p<0,05$). Elias e colaboradores (2002) associaram *irp2* a um maior potencial de patogenicidade de EAEC e relacionou a sua presença a isolados com plasmídio pAA.

Dentre os 60 isolados de EAEC analisados, três hibridizaram com a sonda *daaC*, um marcador utilizado na identificação de DAEC, que apresenta 84% de similaridade com o gene *aafC* de EAEC (SNELLING, MACFARLANE-SMITH, *et al.*, 2009). Além da possibilidade de reação cruzada, a presença de *daaC* em isolados de EAEC, sugere que este gene não é exclusivo de DAEC e pode ser transferido horizontalmente entre patotipos de DEC, conforme previamente evidenciado (OKEKE, LAMIKANRA, *et al.*, 2000; ELIAS, UBER, *et al.*, 2002; PIVA, PEREIRA, *et al.*, 2003; KAHALI, SARKAR, *et al.*, 2004).

Considerando a presença de pelo menos um dos genes que codificam as adesinas fimbriais AAF/I, AAF/II, AAF/III e AAF/IV (*aggA*, *aafA*, *agg*-3A e *hdA*, respectivamente), uma baixa frequência (0-12%) foi encontrada entre os isolados de EAEC, o que corrobora estudos realizados no Brasil e em outros países, que descrevem variando entre 0%-9,1% (*aggA*), 1,7%-11% (*aafA*), 1%-9,6% (*agg-3A*) e 12,9% (*hdaA*) (GIOPPO, ELIAS JR, *et al.*, 2000; VILA, VARGAS, *et al.*, 2000; ELIAS, UBER, *et al.*, 2002; JIANG, GREENBERG, *et al.*, 2002; KAHALI, SARKAR, *et al.*, 2004; SARANTUYA, NISHI, *et al.*, 2004; ZAMBONI, FABBRICOTTI, *et al.*, 2004; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; HUANG, MOHAMED, *et al.*, 2007; MENDEZ-ARANCIBIA, VARGAS, *et al.*, 2008; BOISEN, SCHEUTZ, *et al.*, 2012; MONFARDINI, 2012). As fímbrias de aderência agregativa (AAF) são importantes na adesão inicial da EAEC, primeiro passo para a formação de biofilme (BOISEN, STRUVE, *et al.*, 2008). Dentre os genes codificantes de adesinas, o único estatisticamente associado à formação de biofilme foi *agg3A* ($p<0,05$).

O ensaio de formação de película pelos isolados de EAEC revelou alta frequência (90%) entre elas, maior do que a descrita em estudos anteriores para este patotipo (77,7%-84,6%) (KAHALI, SARKAR, *et al.*, 2004; BHARDWAJ, MAJUMDAR, *et al.*,

2006). A formação de película é um teste rápido e barato e já foi previamente proposto como *screening* de EAEC (YAMAMOTO, ENDO, *et al.*, 1991; ALBERT, QADRI, *et al.*, 1993; KAHALI, SARKAR, *et al.*, 2004; IWANAGA, SONG, *et al.*, 2002). Digno de nota é o fato de que todas as tEAEC foram capazes de formar película e, embora tenha sido também alta a frequência entre as aEAEC (85,3%), o escore de película ≥ 2 foi significantemente associado às tEAEC. Essas associações já foram demonstradas em estudos prévios (OKEKE, LAMIKANRA, *et al.*, 2000; SARANTUYA, NISHI, *et al.*, 2004; WAKIMOTO, NISHI, *et al.*, 2004; JIANG, GREENBERG, *et al.*, 2002; HUANG, MOHAMED, *et al.*, 2007; MENDEZ-ARANCIBIA, VARGAS, *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem, portanto, que o ensaio de formação de película pode ser utilizado para rápido *screening* de EAEC e, o escore ≥ 2, para detecção de isolados com maior potencial patogênico.

6.2.2 *E. coli* com padrão CLA

Dentre as *E. coli* que apresentaram padrão CLA (n=16), 12 genes de virulência foram pesquisados, e dentre esses, genes característicos de EAEC como *aggR*, *aat, aggA*, *aafA*, *agg*-3ª e o gene *set1A* não foram encontrados. Este resultado se contrapõe a estudos anteriores que sugeriam ser o padrão CLA uma variação do padrão AA visto que os isolados apresentavam genes descritos para EAEC (GIOPPO, ELIAS JR, *et al.*, 2000; KAHALI, SARKAR, *et al.*, 2004; BHARDWAJ, MAJUMDAR, *et al.*, 2006), sugerindo desta forma que seriam na realidade um grupo distinto da EAEC. Destaca-se também a alta frequência do gene *pet*, encontrado em 100% dos isolados CLA do presente estudo, em contraposição aos 27% encontrado entre as EAEC. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Monfardini (2012) com amostras CLA provenientes de crianças de comunidades Quilombolas do norte do ES, que não encontrou nenhum gene característico de EAEC (*aat*, *aggA*, *aafA*, *agg*-3A e *set1A*) e encontrou *pet* em alta frequência (92,7%). Estes resultados diferem dos relatados por Gioppo e colaboradores (2000) em amostras CLA oriundas de Londrina, que descrevem frequência baixa do gene *pet* (11%).

Nenhum dos isolados CLA foi capaz de formar biofilme, mas a maior parte (93,8%) formou película na interface ar-líquido, característica também observada por Monfardini et al. (2012), sugerindo que mecanismos diferentes estejam relacionados à formação de cada um deles.

O gene *irp2* foi encontrado em maior frequência em CLA, do que nas EAEC ou aEPEC (43,8%, 36,7% e 10%, respectivamente). Estudo prévio relatou *irp2* em frequência maior em EAEC do que em outros patotipos de DEC e sugeriu que *irp2* pode ser transferido horizontalmente e mantido somente em alguns patotipos (SCHUBERT, RAKIN, *et al.*, 1998).

6.2.3 *E. coli* com padrão da aderência difusa

Neste estudo foram pesquisados prováveis genes de virulência que codificam adesinas afimbriais da família Afa/Dr (*daad* e *afa*), adesinas fimbriais (*aida*/*aah* e *fimA*) e toxinas (*hlyA*, *set1A*, *pet* e *astA*) entre os 42 isolados de DAEC. A grande diversidade genética característica dos isolados de DAEC sustenta a necessidade de estudos epidemiológicos que façam a caracterização fenotípica e genotípica desses isolados, entretanto, poucos trabalhos avaliam o perfil genético deste patotipo (CZECZULIN, WHITTAM, *et al.*, 1999; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002a; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA e GIUGLIANO, 2013). O trabalho que avaliou o maior número de genes de virulência que codificam adesinas, toxinas e sistemas de captação de ferro em isolados de DAEC foi realizado por Lopes et al. (2005). Grande parte dos estudos são restritos a pesquisa de genes que codificam adesinas Afa/Dr (GIRON, HO e SCHOOLNIK, 1991; JALLAT, LIVRELLI, *et al.*, 1993; POITRINEAU, FORESTIER, *et al.*, 1995; FORESTIER, MEYER, *et al.*, 1996; MERAZ, ARIKAWA, *et al.*, 2007).

Os genes que codificam as adesinas afimbriais da família afa/Dr foram identificadas em 52,9% dos nossos isolados de DAEC. Estudos prévios relatam frequências variando entre 13,4%-88% para essas adesinas, revelando que as adesinas Afa/Dr não são as únicas envolvidas no fenótipo DA (BILGE, CLAUSEN, *et al.*, 1989; POITRINEAU, FORESTIER, *et al.*, 1995; FORESTIER, MEYER, *et al.*, 1996; BLANC-POTARD, TINSLEY, *et al.*, 2002; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002a; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005; MERAZ, ARIKAWA, *et al.*, 2007; MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA e GIUGLIANO, 2013; LOZER, SOUZA, *et al.*, 2013). Isolados de DAEC portadores de adesinas Afa/Dr apresentam maior potencial de virulência para causar diarreia com vômito em

<18 meses, diarreia crônica em <2 anos, diarreia em <6 anos e ITU recorrentes (POITRINEAU, FORESTIER, *et al.*, 1995; FORESTIER, MEYER, *et al.*, 1996; GERMANI, BÉGAUD, *et al.*, 1996; JOUVE, GARCIA, *et al.*, 1997; GERMANI, BÉGAUD, *et al.*, 1997; GARCIA, JOUVE, *et al.*, 2000). Além disso, recentemente foram associados à diarreia em adultos (MANSAN-ALMEIDA, PEREIRA e GIUGLIANO, 2013). Em nosso estudo, os isolados de DAEC Afa/Dr+ foram mais frequentes nos <2 anos, enquanto os isolados de DAEC sem estas adesinas foram mais isolados de adultos. Isto sugere que a DAEC pode ser um enteropatógeno importante na população de Vitória, ES, associado à gastroenterite infantil.

O gene *aida*, que codifica adesina fimbrial AIDA-I, responsável pelo fenótipo DA, não foi encontrado em nenhum dos isolados de DAEC e corrobora estudos prévios que descrevem frequência muito baixa ou ausência deste gene (BENZ e SCHMIDT, 1989; JALLAT, LIVRELLI, *et al.*, 1993; BEINKE, LAARMANN, *et al.*, 1998; SCALETSKY, FABBRICOTTI, *et al.*, 2002c; SHERLOCK, SCHEMBRI, *et al.*, 2004).

O gene *fimA* que codifica a subunidade FimA do pilus tipo I de *E. coli*, (TCHESNOKOVA, APRIKIAN, *et al.*, 2011), foi o encontrado em maior frequência dentre todos os genes pesquisados (83%). Esta frequência é maior do que a relatada por Lopes e colaboradores (2005) que encontrou *fimH*, responsável pela síntese de outra subunidade do mesmo pilus, em 50% de seus isolados com fenótipo DA.

Dos genes que codificam as toxinas (*pet*, *set1A* e *astA*), *pet* foi encontrado em maior frequência (58,8%) seguido por *astA* (14,3%) e *set1A* (7%). Lopes e colaboradores (2005), em estudo de caso controle, encontraram taxas semelhantes à do presente estudo para *astA* e *set1A* (15% e 7,1%, respectivamente) em seus isolados de DAEC, estatisticamente associados a crianças com diarreia. Porém, nenhum isolado possuía o gene *pet*, evidenciando a peculiaridade das amostras de DAEC do presente estudo. A presença de genes que codificam toxinas entre os isolados de DAEC, assim como entre as EAEC, indicariam um maior potencial para causar diarreia, conforme previamente sugerido (VILA, VARGAS, *et al.*, 2000; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005; GUIGNOT, CHAPLAIS, *et al.*, 2007).

6.2.4 *E. coli* enteropatogênica atípica

O patotipo aEPEC é aceito como causa de diarreia em crianças e adultos, entretanto também é isolado de indivíduos saudáveis, o que se deve à grande heterogeneidade filogenética e aos genes de virulência adicionais que os isolados de aEPEC podem carrear, dificultando a determinação de quais amostras são verdadeiramente patogênicas (BEUTIN, KAULFUSS e HEROLD, 2005; AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; HERNANDES, VIEIRA, *et al.*, 2006; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; AFSET, ANDERSSEN, *et al.*, 2008; HERNANDES, ELIAS, *et al.*, 2009; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009). Isso ressalta a importância da caracterização genotípica dos isolados de aEPEC. Estudos prévios são unânimes em associar os genes de virulência presentes na PAI OI-122 (*paa*, *nleB*, *nleE*, *sen*/*ent*, *pagC* e *efa1*/*lifA*) à maior patogenicidade dos isolados (BEUTIN, KAULFUSS e HEROLD, 2005; KLAPPROTH, SCALETSKY, *et al.*, 2000; KARMALI, MASCARENHAS, *et al.*, 2003; MORABITO, TOZZOLI, *et al.*, 2003; AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; BIELASZEWSKA, SONNTAG, *et al.*, 2007; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009; BUGAREL, MARTIN, *et al.*, 2011). Três desses genes (*efa1*/*lifA*, *nleE* e *paa*) foram pesquisados neste estudo e encontrados concomitantemente em três de dez isolados, apontando para uma subpopulação dentre os isolados que teriam maior potencial diarreiogênico. Resultado similar foi relatado em outros estudos para os genes *efa1*/*lifA* e *nleE*, mas com variação do gene *paa* (11%-59,6%) (HERNANDES, VIEIRA, *et al.*, 2006; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009; AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006).

Destaca-se que oito dos dez isolados (80%) de aEPEC foram provenientes de crianças menores de cinco anos, embora esta faixa etária corresponda a somente 34% do total de amostras obtidas, indicando que aEPEC pode ser um importante agente etiológico associado à gastroenterite infantil na população de Vitória, ES.

Quatro dos dez dos isolados de aEPEC não carreavam qualquer outro gene de virulência pesquisado, além de *eae*, que define o patotipo. Resultado similar foi descrito por Gomes e colaboradores (2004) que analisaram um grande número de isolados de aEPEC provenientes de crianças e de adultos (HIV+) com gastroenterite, oriundos de São Paulo, Ribeirão Preto e Rio de Janeiro (GOMES, IRINO, *et al.*, 2004).

Pouco é conhecido sobre a adesão da aEPEC à mucosa, portanto a pesquisa de adesinas afimbriais entre os isolados de aEPEC é de extrema importância (TCHESNOKOVA, APRIKIAN, *et al.*, 2011; HERNANDES, VELSKO, *et al.*, 2011). O gene *fimA*, encontrado em outros patotipos de DEC e em isolados de *E. coli* comensais, foi encontrado em frequência similar (90%) à de outros estudos (76% - 100%), sugerindo a importância desta adesina para aderência da aEPEC (AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; HERNANDES, VELSKO, *et al.*, 2011).

O gene *hlyA*, relacionado à maior patogenicidade da amostra e ao destacamento de célula (fenótipo CDEC) em estudos prévios (AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; MAGALHÃES, ROSSATO, *et al.*, 2011; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009) não foi encontrado em nossos isolados de aEPEC, o que corroborou com o resultado de adesão em cultura de células, que também não evidenciou nenhum isolado de aEPEC CDEC. Estudos prévios relatam frequências de *hlyA* em aEPEC entre 1,8% - 31,3%, ressaltando a variação regional da frequência deste gene em isolados de aEPEC (GOMES, IRINO, *et al.*, 2004; AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; HERNANDES, VIEIRA, *et al.*, 2006; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009; BUGAREL, MARTIN, *et al.*, 2011; MAGALHÃES, ROSSATO, *et al.*, 2011).

Os genes *pet*, *set1A* e *astA* codificam toxinas que fazem parte da patogênese da EAEC e foram pesquisados entre os isolados de aEPEC por evidenciarem isolados com maior potencial para causar diarreia (VILA, VARGAS, *et al.*, 2000; DULGUER, FABBRICOTTI, *et al.*, 2003; YATSUYANAGI, SAITO, *et al.*, 2003; LOPES, FABBRICOTTI, *et al.*, 2005; GUIGNOT, CHAPLAIS, *et al.*, 2007). O gene para a toxina *pet* foi encontrado em apenas um dos dez isolados de aEPEC, refletindo a baixa frequência desta toxina em relação à encontrada em EAEC e CLA. Estudos prévios revelam variação na frequência de *pet* em aEPEC entre 1,8%-22,2% (AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; HERNANDES, VIEIRA, *et al.*, 2006). Outras toxinas pesquisadas, *set1A* e *astA*, não foram encontradas entre os isolados do presente estudo. A toxina *astA* é relatada em frequência entre 14%- 51,2% nos isolados de aEPEC (GOMES, IRINO, *et al.*, 2004; AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006; ARAUJO, TABARELLI, *et al.*, 2007; SCALETSKY, ARANDA, *et al.*, 2009). Do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que pesquisa o gene *set1A* em isolados de aEPEC.

O sideróforo *irp2* não foi encontrado em nossos isolados de aEPEC, embora estudos prévios relatem frequências entre 31,3%-55,5% (GOMES, IRINO, *et al.*, 2004; HERNANDES, VIEIRA, *et al.*, 2006). Outro sideróforo pesquisado, *iucA*, encontrado em somente um dos nossos isolados de aEPEC, foi descrito em 3,5% dos isolados de aEPEC (AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006). O gene *chuA* que codifica o receptor Heme foi encontrado em 20% dos nossos isolados de aEPEC; sideróforo este descrito previamente em 52,6% dos isolados de aEPEC (AFSET, BRUANT, *et al.*, 2006).

Deve ser levado em conta o pequeno número de isolados de aEPEC nas amostras obtidas das USB de Vitória que compromete a caracterização adequada deste patotipo.

7. CONCLUSÕES

Patotipos diarreiogênicos de *E. coli*, foram isolados em alta frequência na população estudada, sendo que EAEC e DAEC foram os mais frequentes;

Baixa frequência de EPEC atípica e de ETEC e ausência de EPEC típica, STEC, EHEC e EIEC na população estudada;

A distribuição dos patotipos de DEC pelas regiões de saúde de Vitória ocorreu de forma homogênea, sendo que a região de Maruípe apresentou menor frequência de DEC e a região Continental apresentou maior frequência de DEC pelo número de amostras coletadas;

Os ensaios de hibridização e PCR apresentaram baixa sensibilidade e alta especificidade para detecção de EAEC e de DAEC na população estudada;

Grande heterogeneidade de genes de virulência dentre os isolados de EAEC, DAEC e aEPEC analisados neste estudo;

Este é o primeiro estudo que determina a frequência de EAEC em indivíduos de todas as idades no Brasil;

Dentre os isolados de EAEC os genes que codificam as fímbrias de aderência agregativa AAFI, AAFII, AAFIII e AAFIV foram encontrados em baixas frequências;

A capacidade de formação de biofilme não foi uma característica comum entre os isolados de EAEC, contrastando com a capacidade de formação de película, característica frequente entre eles;

Foram observados marcadores de virulência significantes entre os isolados de tEAEC e de DAEC afa/Dr+, caracterizando subgrupos com maior potencial para causar diarreia;

A formação de biofilme não foi associada à formação de película em isolados de EAEC e em isolados com padrão CLA;

Isolados de *E. coli* com padrão CLA apresentaram perfil de genes de virulência, a formação de biofilme e de película muito distintos dos descritos para EAEC, sugerindo não se tratar de uma variante deste patotipo;

Os isolados com padrão CLA apresentaram alta frequência do gene *pet* e de capacidade de formação de película e ausência de capacidade de formação de biofilme;

Entre os isolados de DAEC, os genes que codificam as adesinas da família afa/Dr foram encontrados em metade dos isolados e o gene que codifica a adesina AIDA-I não foi encontrado, sugerindo que adesinas ainda não caracterizadas e desconhecidas estejam envolvidas na aderência difusa;

Os isolados de DAEC que apresentam as adesinas afa/Dr foram estatisticamente associados à diarreia em menores de dois anos de idade na população estudada.

8. REFERÊNCIAS

ADAM, T. et al. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of Shigella flexneri into HeLa cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 129, p. 367–381, 1995.

ADU-BOBIE, J. et al. Detection of Intimins α, β, γ, and δ, Four Intimin Derivatives Expressed by Attaching and Effacing Microbial Pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 662–668, March 1998. ISSN 3.

AFSET, J. E. et al. Association of atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) with prolonged diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1137-44, Nov 2004. ISSN 11.

AFSET, J. E. et al. Identification of Virulence Genes Linked with Diarrhea Due to Atypical Enteropathogenic Escherichia coli by DNA Microarray Analysis and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3703–3711, October 2006. ISSN 10.

ALBERT, M. J. et al. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 37, p. 3458-3464, 1999. ISSN 11.

ALIKHANI, M. Y. et al. Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic Escherichia coli isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 5, p. 42-47, March 2013. ISSN 1.

ARANDA, K. R. S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in Brazilian children. **FEMS Microbiol Lett**, v. 267, p. 145–150, 2007.

ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5849-53, Dec 2004. ISSN 12.

ARAUJO, J. M. et al. Typical Enteroaggregative and Atypical Enteropathogenic Types of Escherichia coli Are the Most Prevalent Diarrhea-Associated Pathotypes among Brazilian Children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3396–3399, October 2007. ISSN 10.

BARLETTA, F. et al. Analysis Using Multiplex Real-Time PCR for Detection of Diarrheagenic Escherichia coli. Journal of clinical microbiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 1915–1917, June 2009. ISSN 6.

BATISSON, I. et al. Characterization of the Novel Factor Paa Involved in the Early Steps of the Adhesion Mechanism of Attaching and Effacing Escherichia coli. **Infect Immun.**, v. 71, p. 4516–4525, August 2003. ISSN 8.

BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative Escherichia coli, a recently discovered diarrheal pathogen. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 1249-51, Jun 1990. ISSN 6.

BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative Escherichia coli, a recently discovered diarrheal pathogen. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 1249–1251, 1990.

BAUMLER, A. J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of lpfABCDE, a putative fimbrial operon of Salmonella typhimurium. **J Bacteriol.**, v. 177, p. 2087–2097, April 1995. ISSN 8.

BEKAL, S. et al. Rapid Identification of Escherichia coli Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2113–2125, May 2003. ISSN 5.

BELL, B. P. et al. A multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. the Washington experience. **JAMA**, v. 272, p. 1349-1, November 1994. ISSN 17.

BELLIN, T. et al. Rapid detection of enterohemorrhagic Escherichia coli by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 370–374, January 2001. ISSN 1.

BELOIN, C. et al. Global impact of mature biofilm lifestyle on Escherichia coli K-12 gene expression. **Mol. Microbiol**, v. 51, p. 659-674, 2004. ISSN 3.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J. M. Escherichia coli biofilms. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 322, p. 249-289, 2008.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 1506–1511, 1989.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Diffuse adherence of enteropathogenic Escherichia coli strains—processing of AIDA-I. **Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.**, v. 278, p. 197–208, 1993.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Glycosylation with heptose residues mediated by the aah gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. **Mol Microbiol.**, v. 40, p. 1403-13, Jun 2001. ISSN 6.

BERGER, C. N. et al. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 9, p. 2385-97, sep 2010.

BERN, C. et al. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bull World Health Organ**, v. 70, p. 705-714, 1992. ISSN 6.

BERNET-CAMARD, M. F. et al. Pathogenicity of the diffusely adhering strain Escherichia coli C1845: F1845 adhesindecay accelerating factor interaction, brush border microvillus injur and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1918–1928, June 1996. ISSN 6.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative Escherichia coli as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4302-4311, 2002. ISSN 8.

BERTHIAUME, F. et al. Growth-phase-dependent expression of the operon coding for theglycosylatedautotransporteradhesinAIDA-Iofpathogenic Escherichia coli. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 311, p. 176–184, 2010.

BÉTIS, F. et al. Afa/Dr Diffusely Adhering Escherichia coli Infection in T84 Cell Monolayers Induces Increased Neutrophil Transepithelial Migration, Which in Turn Promotes Cytokine-Dependent Upregulation of Decay-Accelerating Factor (CD55), the Receptor for Afa/Dr Adhesin. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1774–1783, April 2003. ISSN 4.

BEUTIN, L.; KAULFUSS, S.; HEROLD, S. Genetic Analysis of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli Serogroup O103 Strains by Molecular Typing of Virulence and Housekeeping Genes and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1552–1563, April 2005. ISSN 4.

BHAN, M. K. et al. Enteroaggregative Escherichia coli Associated with Persistent Diarrhea in a Cohort of Rural Children in India. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, p. 1061-1064, 1989. ISSN 6.

BHARDWAJ, R. et al. Characterization of adhesin variants in Indian isolates of enteroaggregative Escherichia coli. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 258, p. 274-283, 2006. ISSN 2.

BIELASZEWSKA, M. et al. Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic Escherichia coli in atypical enteropathogenic Escherichia coli O26. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 891–897, June 2007. ISSN 7.

BIELASZEWSKA, M. et al. Shiga Toxin-Negative Attaching and Effacing Escherichia coli: Distinct Clinical Associations with Bacterial Phylogeny and Virulence Traits and Inferred In-Host Pathogen Evolution. **Clin Infect Dis**, v. 47, p. 208-217, 2008. ISSN 2.

BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 9, p. 671-6, Sep 2011.

BILGE, S. S. et al. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated Escherichia coli to HEp-2 cells. **J Bacteriol.**, v. 171, p. 4281–4289, August 1989. ISSN 8.

BLANCO, M. et al. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing Escherichia coli isolated from cattle and beef products in Argentina. **Int Microbiol**, v. 7, p. 269-76, Dec 2004. ISSN 4.

BOISEN, N. et al. New Adhesin of Enteroaggregative Escherichia coli Related to the Afa/Dr/AAF Family. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 3281–329, July 2008. ISSN 7.

BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative Escherichia coli related to the Afa/Dr/AAF family. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 281-292, 2008. ISSN 7.

BOISEN, N. et al. Genomic characterization of enteroaggregative Escherichia coli from children in Mali. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, p. 431-444, 2012. ISSN 3.

BOLICK, D. T. et al. Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) Strain in a Novel Weaned Mouse Model: Exacerbation by Malnutrition, Biofilm as a Virulence Factor, and Treatment by Nitazoxanide. **J Med Microbiol**, March 2013.

BOLICK, D. T. et al. Enteroaggregative Escherichia coli strain in a novel weaned mouse model: exacerbation by malnutrition, biofilm as a virulence factor and treatment by nitazoxanide. **Journal of medical microbiology**, v. 62(Pt 6), p. 896-905, January 2013.

BOSCHI-PINTO, C.; VELEBITB, L.; SHIBUYAC, K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, p. 710-19, September 2008. ISSN 9.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of Bact. coli neapolitanum from summer diarrhœa of infants. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 239-247, march 1945.

BRENNER, D. J. et al. Polynucleotide sequence relatedness among Shigella species. **Int. J. Syst. Bacteriol**, v. 23, p. 1–7, 1973.

BREST, P. et al. Increased Rate of Apoptosis and Diminished Phagocytic Ability of Human Neutrophils Infected with Afa/Dr Diffusely Adhering Escherichia coli Strains. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5741–5749, October 2004. ISSN 10.

BRETT, K. N. et al. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing Escherichia coli isolates commonly possess stx2-EDL933 and/or stx2vhb subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2716-22, Jun 2003. ISSN 6.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic Escherichia coli categories among the traditional enteropathogenic E. coli O serogroups - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 99, p. 545-552, October 2004. ISSN 6.

CASSELS, F. J.; WOLF, M. K. Colonization factors of diarrheagenic E. coli and their intestinal receptors. **Journal of industrial microbiology**, v. 15, p. 214-26, Sep 1995. ISSN 3.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative Escherichia coli Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2138–2140, May 2003. ISSN 5.

CHAUDHURI, R. R. et al. Complete Genome Sequence and Comparative Metabolic Profiling of the Prototypical Enteroaggregative Escherichia coli Strain 042. **PLoS One**, v. 5, 2010. ISSN 10.

CHIN, J. **Control of communicable diseases manual**. 17th. ed. Washington: American Public Health Association, 2000. 11- 12 p.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic E. coli. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 1-17, march/april 2012.

COBELJIC, M. et al. Enteroaggregative Escherichia coli associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiol. Infect**, v. 117, p. 11-16, 1996.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999. ISSN 5418.

CRAVIOTO, A. et al. An adhesive factor found in strains ofEscherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nature Reviews**, v. 8, january 2010.

CZECZULIN, J. R. et al. Aggregative Adherence Fimbria II, a Second Fimbrial Antigen Mediating Aggregative Adherence in Enteroaggregative Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 4135–4145, Oct 1997. ISSN 10.

CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2692–2699, June 1999. ISSN 6.

D'ORAZIO, S. E.; COLLINS, C. M. Molecular pathogenesis of urinary tract infections. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**, v. 225, p. 137–164, 1998.

DALLAS, W. S.; FALKOW, S. Amino acid sequence homology between cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin. **Nature**, v. 288, p. 499-501, December 1980.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 64, p. 847-867, 2000. ISSN 4.

DEAN, A. G. et al. Test for Escherichia coli Enterotoxin Using Infant Mice: Application in a Study of Diarrhea in Children in Honolulu. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 125, april 1972. ISSN 4.

DENAMUR, E. The 2011 Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4 German outbreak: a lesson in genomic plasticity. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1124–1125, August 2011. ISSN 8.

DOLORES, E. G.; EVANS, D. J. J. New Surface-Associated Heat-Labile Colonization Factor Antigen (CFA/II) Produced by Enterotoxigenic Escherichia coli of Serogroups 06 and 08. **Infection and Immunity**, v. 21, p. 638-647, Aug 1978. ISSN 2.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol**, v. 15, p. 167-193, 2002. ISSN 2.

DOUGHTY, S. et al. Identification of a Novel Fimbrial Gene Cluster Related to Long Polar Fimbriae in Locus of Enterocyte Effacement-Negative Strains of Enterohemorrhagic Escherichia coli. **Infection and Immunity** , v. 70, p. 6761–6769, December 2002. ISSN 12.

DULGUER, M. V. et al. atypical enteropathogenic Escherichia coli strais: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between anteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin and diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 1685-1694, dec 2003. ISSN 11.

DUNNE, W. M. J. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clin. Microbiol. Rev**, v. 15, p. 155-166, 2002. ISSN 2.

ELLIOTT, E. J. et al. Nationwide study of haemolytic uremic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. **Arch. Dis. Child**, v. 85, p. 125–131, 2001.

ELLIOTT, S. J. et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic Escherichia coli E2348/69. **Mol Microbiol.**, v. 28, p. 1-4, Apr 1998. ISSN 1.

EPPINGERA, M. et al. Genomic anatomy of Escherichia coli O157:H7 outbreaks. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, p. 20142–20147, December 2011. ISSN 50.

ESLAVA, C. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3155-63, Jul 1998. ISSN 7.

EVANS, D. G. et al. Plasmid-Controlled Colonization Factor Associated with Virulence in Escherichia coli Enterotoxigenic for Humans. **Infection and Immunity**, v. 12, p. 656-667, Sept 1975. ISSN 3.

EVANS, D. J. J. et al. Stimulation of adenyl cyclase by Escherichia coli enterotoxin. **Nature**, v. 236, p. 137-8, 1972. ISSN 66.

FASANO, A. et al. Shigella enterotoxin 1: an enterotoxin of Shigella flexneri 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. **J Clin Invest.**, v. 95, p. 2853–2861, June 1995. ISSN 6.

FIALHO, O. B. et al. Detection of diarrheagenic Escherichia coli using a two-system multiplex-PCR protocol. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 27, p. 155-61, March 2013. ISSN 2.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, September 2010.

FRANK, C. et al. Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. **Euro Surveill**, v. 16, p. 2-4, 2011.

FRANZOLIN, M. R. et al. Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 359-363, July 2005. ISSN 4.

GASSAMA-SOW, A. et al. Characterization of Pathogenic Escherichia coli in Human Immunodeficiency Virus–Related Diarrhea in Senegal. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 75-78, 2004.

GHOSH, P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 771–795, Dec. 2004. ISSN 4.

GIOPPO, N. M. R. et al. 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 Microbiology Letters** , v. 190, p. 293-298, July 2000.

GIRON, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli, **Infection and Immunity**, v. 254, n. 5032, p. 710-3, nov 1991.

GOLDBERG, M. B.; SANSONETTI, P. J. Shigella subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. **Infection and Immunity.**, v. 61, p. 4941–4946, 1993.

GOMES, T. A. T. et al. Emerging Enteropathogenic Escherichia coli Strains? **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1851-1855, October 2004. ISSN 10.

GREENBERG, D. E. et al. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative Escherichia coli pathogenicity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 944–949, 2002.

GUIGNOT, J. et al. Pyelonephritogenic diffusely adhering Escherichia coli EC7372 harboring Dr-II adhesin carries classical uropathogenic virulence genes and promotes cell lysis and apoptosis in polarized epithelial caco-2/TC7 cells. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 7018-7027, 2000. ISSN 12.

GUIGNOT, J. et al. Recruitment of CD55 and CD66e Brush Border-Associated Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins by Members of the Afa/Dr Diffusely Adhering Family of Escherichia coli That Infect the Human Polarized Intestinal Caco-2/TC7 Cells. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3554–3563, June 2000. ISSN 6.

GUIGNOT, J. et al. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cell Microbiol.**, v. 9, p. 204-21, Jan 2007. ISSN 1.

GUION, C. E. et al. Detection of Diarrheagenic Escherichia coli by Use of Melting-Curve Analysis and Real-Time Multiplex PCR. **J Clin Microbiol.**, v. 46, p. 1752–1757, May 2008. ISSN 5.

GUYER, D. M. et al. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic Escherichia coli. **Molecular Microbiology**, v. 38, p. 53–66, October 2000. ISSN 1.

HARAS, D.; AMOROS, J. P. Polymerase chain reaction, cold probes and clinical diagnosis. **Sante**, v. 4, p. 43-52, Jan-Feb 1994. ISSN 1.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative Escherichia coli infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 12–18, January 2006. ISSN 1.

HEDBERG, C. W. et al. An outbreak of foodborne illness caused by Escherichia coli O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic E. coli. **J Infect Dis.**, v. 176, p. 1625-8, Dec 1997. ISSN 6.

HENDERSON, I. R. et al. Characterization of pic, a secreted protease of Shigella flexneri and enteroaggregative Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5587–5596, November 1999. ISSN 11.

HERNANDES, R. T. et al. Characterization of Atypical Enteropathogenic Escherichia coli Strains That Express Typical Localized Adherence in HeLa Cells in the Absence of the Bundle-Forming Pilus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4214–4217, Nov 2006. ISSN 11.

HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic Escherichia coli. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, p. 137-149, August 2009.

HICKS, S.; CANDY, D. C. A.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative Escherichia coli to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4751–4760, Nov 1996. ISSN 11.

HIEN, B. T. T. et al. Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella Strains Isolated from Children in a Hospital Case-Control Study in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 996–1004, March 2008. ISSN 3.

HUANG, D. B. et al. Escherichia coli is a cause of acute diarrheal illness: a metaanalysis. **Clin Infect Dis**, v. 43, p. 556–563, 2006.

HUANG, D. B. et al. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative Escherichia coli isolates from travellers to developing countries. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 1386-1392, 2007. ISSN 10.

HUANG, D. B.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative Escherichia coli: An emerging pathogen in children. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, p. 266-271, 2004. ISSN 4.

JALLAT, C. et al. Escherichia coli strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2031-7, 1993. ISSN 8.

JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 7839-7843, October 1990.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) Escherichia coli. **International journal of medical microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 383-404, oct 2005.

KAHALI, S. et al. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative Escherichia coli isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4111-4120, 2004. ISSN 9.

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

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews**, v. 2, p. 123- 138, february 2004.

KARCH, H.; MELLMANN, A.; BIELASZEWSKA, M. Epidemiology and pathogenesis of enterohaemorrhagic Escherichia coli. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 122, p. 417-424, 2009. ISSN 11/12.

KARMALI, M. A. et al. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxinproducing Escherichia coli in stools. **Lancet**, v. 1, p. 619–620, March 1983. ISSN 8325.

KARMALI, M. A. et al. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli in stools. **Lancet**, v. 1, p. 619-620, Mar 1993. ISSN 8325.

KARMALI, M. A. et al. Association of Genomic O Island 122 of Escherichia coli EDL 933 with Verocytotoxin-Producing Escherichia coli Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. **J Clin Microbiol.**, v. 41, p. 4930–4940, November 2003. ISSN 11.

KELLER, R. et al. Afa, a Diffuse Adherence Fibrillar Adhesin Associated with Enteropathogenic Escherichia coli. **Infection and immunity**, v. 70, n. 5, p. 2681-9, may 2002.

KELLY, M. et al. Essential Role of the Type III Secretion System Effector NleB in Colonization of Mice by Citrobacter rodentium. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 2328–2337, Apr 2006. ISSN 4.

KENNY, B. et al. Enteropathogenic E. coli (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. **Cell**, v. 91, p. 511–520, November 1997. ISSN 14.

KESTY, N. C. et al. Enterotoxigenic Escherichia coli vesicles target toxin delivery into mammalian cells. **EMBO Journal**, v. 23, p. 4538–4549, November 2004. ISSN 23.

KJÆRGAARD, K. et al. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 2, p. 695–702, December 2000. ISSN 6.

KLAPPROTH, J.-M. A. et al. A Large Toxin from Pathogenic Escherichia coli Strains That Inhibits Lymphocyte Activation. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2148–2155, April 2000. ISSN 4.

KNUTTON, S. et al. Ability of enteroaggregative Escherichia coli strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2083–2091, 1992.

KONEMAN, E. et al. **Konemsn's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6. ed. [S.l.]: Lippincott Williams E Wilkins, 2006.

KOZUB-WITKOWSKI, E. et al. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 403–410, February 2008. ISSN 2.

LACHER, D. W.; STEINSLAND, H.; WHITTAM, T. S. Allelic subtyping of the intimin locus (eae) of pathogenic Escherichia coli by fluorescent RFLP. **FEMS Microbiology Letters**, v. 261, p. 80-87, August 2006. ISSN 1.

LE BOUGUÉNEC, C. et al. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1738–1745, May 2001. ISSN 5.

LEVINE, M. M. et al. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic Escherichia coli is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 152, p. 550-9, Sep 1985. ISSN 3.

LIMA, I. F. et al. Prevalence of enteroaggregative Escherichia coli and its virulence-related genes in a case–control study among children from north-eastern Brazil. **J Med Microbiol.**, May, v. 62, p. 683-93, 2013. ISSN Pt 5.

LOPES, L. M. et al. Heterogeneity among Strains of Diffusely Adherent Escherichia coli Isolated in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology** , v. 43, p. 1968–1972, April 2005. ISSN 4.

LÓPEZ-SAUCEDO, C. et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic Escherichia coli. **Emerg Infect Dis.**, v. 9, 2003. ISSN 1.

LORENZO, V.; NEILANDS, J. Characterization of iucA and iucC genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in Escherichia coli. **Journal Bacteriol**, v. 167, p. 350-355, 1986. ISSN 1.

LOZER, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from Brazilian children living in rural communities. **BMC Infectoius Diseases**, 2013.

LU, Y. et al. A New Immunoglobulin-Binding Protein, EibG, Is Responsible for the Chain-Like Adhesion Phenotype of Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 5747–5755, October 2006. ISSN 10.

MAGALHÃES, C. A. et al. The ability of haemolysins expressed by atypical enteropathogenic Escherichia coli to bind to extracellular matrix components. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 106, p. 146-52, Mar 2011. ISSN 2.

MANSAN-ALMEIDA, R.; PEREIRA, A. L.; GIUGLIANO, L. G. Diffusely adherent Escherichia coli strains isolated from children and adults constitute two different populations. **BioMed Central Microbiology**, v. 13, p. 1-14, February 2013. ISSN 22.

MCDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **PNAS**, v. 92, p. 1664-1668, February 1995.

MCDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12. **Mol Microbiol.**, v. 23, p. 399-407, Jan 1997. ISSN 2.

MENDEZ-ARANCIBIA, E. et al. Prevalence of Different Virulence Factors and Biofilm Production in Enteroaggregative Escherichia coli Isolates Causing Diarrhea in Children in Ifakara (Tanzania). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, p. 985–989, 2008. ISSN 6.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde - Relatório de Situação**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília/DF, p. 14. 2011. (5).

MOHAMED, D. B. et al. Association of putative enteroaggregative Escherichia coli virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 121-126, 2007. ISSN 1.

MONFARDINI, M. V. **Caracterização genotípica e fenotípica de amostras de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) e com padrão chain-like adhesion (CLA) isoladas de crianças com e sem diarreia**. Dissertação de Mestrado - UFES - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. VITÓRIA - ES, p. 57-58. 2012. (M742c).

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines. **Infection and immunity**, v. 41, p. 1340-51, Sep 1983. ISSN 3.

MORABITO, S. et al. A Mosaic Pathogenicity Island Made Up of the Locus of Enterocyte Effacement and a Pathogenicity Island of Escherichia coli O157:H7 Is Frequently Present in Attaching and Effacing E. coli. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3343–3348, June 2003. ISSN 6.

MORENO, A. C. R. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, p. 50-57, 2010. ISSN 1.

MORIN, N. et al. Autoactivation of theAggRregulatorof enteroaggregative Escherichia coli invitro andin vivo. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 58, p. 344-55, Apr 2010. ISSN 3.

MORRISON, T. B.; WEIS, J. J.; WITTWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, v. 24, p. 954-962, 1998.

MOSELEY, S. L. et al. Identification of Enterotoxigenic Escherichia coli by Colony Hybridization Using Three Enterotoxin Gene Probes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 145, p. 863-869, 1982. ISSN 6.

MOUNIER, J. et al. Shigella flexneri Enters Human Colonic Caco-2 Epithelial Cells through the Basolateral Pole. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 237-248, Jan 1992. ISSN 1.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Ann Biol Clin**, Paris, v. 48, p. 579-82, 1990. ISSN 8.

MULVEY, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli. **Cell. Microbiol.**, v. 4, p. 257–271, 2002.

MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; HULTGREN, S. J. Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 4572–4579, 2001.

NADLER, C. et al. The Type III Secretion Effector NleE Inhibits NF-κB Activation. **PLoS Pathog**, v. 6, p. 1-11, January 2010. ISSN 1.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 443–454, Octobe 2005. ISSN 6–7.

NATARO, J. P. Enteroaggregative Escherichia coli pathogenesis. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 21, p. 4–8, 2005.

NATARO, J. P. Diarrhea among children in developing countries. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 764, p. 73-80, May 2013.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 6, n. 9, p. 829-31, setembro 1987.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, p. 829-831, 1987. ISSN 9.

NATARO, J. P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative Escherichia coli mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2297–2304, June 1992. ISSN 6.

NATARO, J. P. et al. AggR, a transcriptional activator of Aggregative Adherence Fimbria I expression in enteroaggregative Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 4691-4699, Aug 1994. ISSN 15.

NATARO, J. P. et al. Heterogeneity of enteroaggregative Escherichia coli virulence demonstrated in volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. 465-468, 1995. ISSN 2.

NATARO, J. P. et al. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella strains. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4721–4728, 1995.

NATARO, J. P. et al. Diarrheagenic Escherichia coli Infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 402-407, August 2006. ISSN 4.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan 1998.

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative Escherichia coli. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, 1998. ISSN 2.

NAVARRO-GARCÍA, F. et al. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3149–3154, July 1998. ISSN 7.

NGUYEN, R. N. et al. Atypical Enteropathogenic Escherichia coli Infection and Prolonged Diarrhea in Children. **Emerg Infect Dis.**, v. 12, p. 597–603, April 2006. ISSN 4.

NICHOLLS, L.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic Escherichia coli to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 35, p. 275–288 , January 2000. ISSN 2.

NISHI, J. et al. The export of coat protein from enteroaggregative Escherichia coli by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J Biol Chem**, v. 278, p. 45680–45689, Nov 2003. ISSN 46.

NOWICKI, B. et al. A hemagglutinin of uropathogenic Escherichia coli recognizes the Dr blood group antigen. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 1057-60, May 1988. ISSN 5.

NOWICKI, B. et al. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated Escherichia coli belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 279-281, Jan 1990. ISSN 1.

NOWICKI, B.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, S. Family of Escherichia coli Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. S24–S27, 2001. ISSN (Suppl. 1).

NUNES, E. B. et al. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing Escherichia coli (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 499–504, February 2003.

O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol.Rev.**, v. 51, p. 206-220, June 1987. ISSN 2.

OCHOA, T. J. et al. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic Escherichia coli among infants from Periurban areas in Lima, Peru. **Clin Infect Dis.**, v. 49, p. 1694–1702, December 2009. ISSN 11.

OCHOA, T. J. et al. Frecuencia y patotipos de Escherichia coli diarrogénica em niños peruanos con y sin diarrea. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 28, p. 13-20, February 2011. ISSN 1.

OKEKE, I. N. et al. Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4525–4530, 2003.

OKEKE, I. N. et al. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative Escherichia coli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, January 2004. ISSN 1.

PARMA, A. E. et al. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic Escherichia coli isolated from cattle and foods in Argentina. **Eur. J. Epidemiol**, v. 16, p. 757–762, 2000.

PATON, A. W. et al. Molecular characterization of a Shiga toxigenic Escherichia coli O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3357-61, Oct 1999. ISSN 10.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 450–479, July 1998. ISSN 3.

PEIFFER, I. et al. Structural and functional lesions in brush border of human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells infected by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 5979–5990, October 2000. ISSN 10.

PIVA, I. C. et al. Virulence markers of enteroaggregative Escherichia coli isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1827–1832, 2003.

PULKKINEN, W. S.; MILLER, S. I. A Salmonella typhimurium virulence protein is similar to a Yersinia enterocolitica invasion protein and a bacteriophage lambda outer membrane protein. **Journal Bacteriol**, v. 173, p. 86–93, January 1991. ISSN 1.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries:epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical Microbiol Review**, v. 18, p. 465–483, 2005.

REGUA-MANGIA, A. H. et al. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic Escherichia coli strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Infection**, v. 48, p. 161-167, 2004. ISSN 2.

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare Escherichia coli Serotype. **New England Journal Medical**, v. 308, p. 681-5, Mar 1983. ISSN 12.

ROBERT-KOCH-INSTITUTE. EHEC/HUS O104:H4 – The outbreak is considered to be over. **http://www.rki.de/EN/Home/PM_EHEC.html**, 2011. Acesso em: 2013.

ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Escherichia coli as a cause of diarrhea. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17 , p. 467–475, April 2002. ISSN 4.

RODRIGUES, J. et al. Prevalence of diarrheogenic Escherichia coli and rotavirus among children from Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1311-1318, 2002.

RODRIGUES, J. et al. Reduced Etiological Role for Enteropathogenic Escherichia coli in Cases of Diarrhea in Brazilian Infants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 398-400, 2004. ISSN 1.

RÚGELES, L. C. et al. Molecular characterization of diarrheagenic Escherichia coli strains from stools samples and food products in Colombia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 282–286, April 2010. ISSN 3.

RUIZ, J. et al. Prevalence of the Sat gene among clinical isolates of Shigella spp. causing travelers' diarrhea: geographical and specific differences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1565-1566, 2002. ISSN 4.

SAMAL, S. K. et al. Incidence of bacterial enteropathogens among hospitalized diarrhea patients from Orissa, India. **Jpn J Infect Dis.**, v. 61, p. 350-5, Sep 2008. ISSN 5.

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

SANSONETTI, P. J. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, p. G319-G323, 2001.

SASAKAWA, C. A new paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of Shigella. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences**, v. 86, p. 229–243, March 2010. ISSN 3.

SAVANNO, S. J. et al. Enteroaggregative Escherichia coli elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J Clin Invest**, v. 87, p. 1450–1455, April 1991. ISSN 4.

SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 3093-3097, April 1993.

SAVARINO, S. J. et al. Identification and Characterization of a Gene Cluster Mediating Enteroaggregative Escherichia coli Aggregative Adherence Fimbria I Biogenesis. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 176, p. 4949-4957, Aug 1994. ISSN 16.

SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative E. coli. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 1019-1022, 1996. ISSN 4.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D. C. Enteroaggregative Escherichia coli elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest**, v. 87, p. 1450-1455, 1991. ISSN 4.

SCALETSKY, I. C. A. et al. EPEC adherence to HEp-2 cells. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 58–62, 1996. ISSN 1.

SCALETSKY, I. C. A. et al. Diffusely Adherent Escherichia coli as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 645–648, Feb 2002. ISSN 2.

SCALETSKY, I. C. A. et al. HEp-2–Adherent Escherichia coli Strains Associated with Acute Infantile Diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 855-858, August 2002b. ISSN 8.

SCALETSKY, I. C. A. et al. Evidence of Pathogenic Subgroups among Atypical Enteropathogenic Escherichia coli Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3756–3759, November 2009. ISSN 11.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive Patterns of Adherence of Enteropathogenic Escherichia coli to HeLa Cells. **Infection and Immunity**, v. 45, p. 534-536, Aug. 1984. ISSN 2.

SCALETSKY, I. C. et al. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infection and Immunity** , v. 67, p. 3410-5, Jul 1999. ISSN 7.

SCHEMBRI, M. A.; KJÆRGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in Escherichia coli biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 253–267, April 2003. ISSN 1.

SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular Pathogenesis of Shigella spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 134–156, January 2008. ISSN 1.

SCHUBERT, S. et al. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of Yersinia species among Escherichia coli strains that are pathogenic to humans. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 480-485, fEB. 1998. ISSN 2.

SCHULZ, S. et al. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. **Cell**, v. 63, p. 941-948, November 1990. ISSN 5.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiological reviews**, v. 60, p. 167-215, Mar 1996. ISSN 1.

SHAH, N.; DUPONT, H. L.; RAMSEY, D. J. Global Etiology of Travelers' Diarrhea: Systematic Review from 1973 to the Present. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 609-614, 2009. ISSN 4.

SHAKOOR, S.; ZAIDI, A. K. M. Tropical bacterial gastrointestinal infections. **Infect Dis Clin** , v. 26, p. 437-53, Jun 2012. ISSN 2.

SHEIKH, J. et al. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative Escherichia coli. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 983-997, 2001. ISSN 5.

SHEIKH, J. et al. a novel dispersion protein in enteroaggregative escherichia coli. **J Clin Invest.**, v. 110, p. 1329–1337, November 2002. ISSN 9.

SHETTY, V. A. et al. Prevalence and characterization of diarrheagenic Escherichia coli isolated from adults and children in Mangalore, India. **J Lab Physicians.**, v. 4, p. 24-9, Jan 2012. ISSN 1.

SMALL, P. L.; FALKOW, S. Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive Escherichia coli that are required for entry into HEp-2 cells. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 225–229, January 1988. ISSN 1.

SMYTH, C. J.. Two Mannose-resistant Haemagglutinins on Enterotoxigenic Escherichia coli of Serotype O6:K15:H16 or H– Isolated from Travellers’ and Infantile Diarrhoea. **Journal of General Microbiology**, v. 128, p. 2081-2096, 1982.

SOUZA, E. C. et al. Perfil etiológico das diarréias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 31-38, 2002. ISSN 1.

SOUZA, T. B. et al. real time multiplex pcr assay and melting curve analysis for identifying diarrheagenic escherichia coli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 1031-3, Mar 2013. ISSN 3.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Microbiological reviews**, v. 56, p. 622-647, 1992. ISSN 4.

SPANO, L. C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent Escherichia coli in Brazilian children with acute diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 359–363, November 2008.

STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative Escherichia coli Produce Intestinal Inflammation and Growth Impairment and Cause Interleukin-8 Release from Intestinal Epithelial Cells. **J Infect Dis**, v. 177, p. 88-96, 1998. ISSN 1.

STEYERT, S. R.; RASKO, D. A.; KAPER, J. B. Functional and Phylogenetic Analysis of ureD in Shiga Toxin-Producing Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 193, p. 875–886, February 2011. ISSN 4.

SVENUNGSSON, B. et al. Enteropathogens in Adult Patients with Diarrhea and Healthy Control Subjects: A 1-Year Prospective Study in a Swedish Clinic for Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 770–78, 2000.

TARTOF, S. Y.; SOLBERG, O. D.; RILEY, L. W. Genotypic analyses of uropathogenic Escherichia coli based on fimH single nucleotide polymorphisms (SNPs). **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1363–1369, 2007.

TAUSCHEK, M. et al. identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat labile enterotoxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 7066–7071, May 2002. ISSN 10.

TENOVER, F. C. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.** , v. 1, p. 82-101, January 1988. ISSN 1.

THOMAS, L. V. et al. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic Escherichia coli in humans. **Infection and Immunity**, v. 35, p. 1119-24, Mar 1982. ISSN 3.

THOMAS, L. V. et al. The Possession of Three Novel Coli Surface Antigens by Enterotoxigenic Escherichia coli Strains Positive for the Putative Colonization Factor PCF8775. **Journal of General Microbiology**, v. 131, p. 2319-2326, 1985. ISSN 9.

TOBE, T. et al. An extensive repertoire of type III secretion effectors in Escherichia coli O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. **PNAS**, v. 103, p. 14941–14946, October 2006. ISSN 40.

TORRES, A. G.; PAYNE, S. M. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. **Mol. Microbiol.**, v. 23, p. 825-833, 1997. ISSN 4.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of Diarrheagenic Escherichia coli Strains to Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 18–29, Jan 2005. ISSN 1.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. [S.l.]: Atheneu, 2008.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic Escherichia coli. **Emerging Infect Diseases**, v. 8, p. 508-513, may 2002. ISSN 5.

TURNER, S. M. et al. Weapons ofmass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic Escherichia coli. **FEMS Microbiol Lett** , v. 263, p. 10–20, 2006.

USEIN, C. R. et al. Escherichia coli pathotypes associated with diarrhea in Romanian children younger than 5 years of age. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 62, p. 289-293, 2009.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. **Res. Microbiol**, v. 156, p. 626-733, 2005. ISSN 5-6.

VIAL, P. A. et al. Characterization of enteroadherentaggregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 158, p. 70-79, 1988. ISSN 1.

VIEIRA, M. A. M. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of Escherichia coli strains of non-enteropathogenic E. coli (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 762-72, Mar 2001. ISSN 5.

VIEIRA, M. A. M. et al. Prevalence and Characteristics of the O122 Pathogenicity Island in Typical and Atypical Enteropathogenic Escherichia coli Strains. **Journal of Clinical Microbiology** , v. 48, Apr 2010. ISSN 4.

VILA, J. et al. Enteroaggregative escherichia coli virulence factors in traveler's diarrhea strains. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1780-1783, 2000. ISSN 6.

VILCHEZ, S. et al. Prevalence of diarrhoeagenic Escherichia coli in children from León, Nicaragua. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 630–637, 2009.

VILJANEN, M. K. et al. Outbreak of diarrhoea due to Escherichia coli O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet.** , v. 336, p. 831-834, Oct 1990. ISSN 8719.

WAI, S. N.; TAKADE, A.; AMAKO, K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative Escherichia coli strains. **FEMS Microbiol Lett**, v. 135, p. 17-22, 1996.

WALKER, C. L. et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **Lancet**, v. 381, p. 1405-16, Apr 2013. ISSN 9875.

WANG, X.; PRESTON, J. F.; ROMEO, T. The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 2724-2734, 2004. ISSN 9.

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

WERBER, D. et al. Outbreaks of virulent diarrheagenic Escherichia coli - are we in control? **BMC Medicine**, v. 10, 2012. ISSN 11.

WHO, W. H. O. Programme for control of diarrheal diseases (CDD/83.3 Rev1). **Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections**, Geneva, 1987. 27.

WHO, W. H. O. UN-water global annual assessment of sanitation and drinking-water (GLAAS) 2012 report: the challenge of extending and sustaining services. **UN-Water Global Analysis and Assessment of Sanitation and Drinking-Water (GLAAS)**, Geneva, 2012.

WOLF, M. K. Occurrence, Distribuition, and Associations of O and H Serogroups, Colonization Factor Antigens, and Toxins of Enterotoxigenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 569-584, oct 1997. ISSN 4.

WONG, A. R. C. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: even more subversive elements. **Molecular Microbiology** , v. 80, p. 1420–1438, 2011. ISSN 6.

YAMAMOTO, T. et al. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by Escherichia coli isolated from patients with diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 1295-310, Dec 1992. ISSN 6.

YATSUYANAGI, J. et al. Characterization of Atypical Enteropathogenic Escherichia coli Strains Harboring the astA Gene That Were Associated with a Waterborne Outbreak of Diarrhea in Japan. **J Clin Microbiol.**, v. 41, p. 2033–2039, May 2003. ISSN 5.

ZURAWSKI, D. V. et al. The NleE/OspZ Family of Effector Proteins Is Required for Polymorphonuclear Transepithelial Migration, a Characteristic Shared by Enteropathogenic Escherichia coli and Shigella flexneri Infections. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 369–379, Jan 2008. ISSN 1.

ANEXO I

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, 01 novembro de 2007

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

Para: Profª. Drª Liliana Cruz Spano
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **"Marcadores de virulência na determinação de categorias diarreiogênicas de *E. coli* em pacientes de Unidades de Saúde do Município de Vitória-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-089/07**, intitulado: **"Marcadores de virulência na determinação de categorias diarreiogênicas de *E. coli* em pacientes de Unidades de Saúde do Município de Vitória-ES"**, 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 31 de outubro de 2007.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável 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

ANEXO II

MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADOS

Meios para isolamento e identificação de *E. coli*

Ágar Mac ConKey

Ágar MacConkey em pó **(Himedia)**.....51,5 g

H_2O qsp.....1000 mL

Ágar Nutriente

Ágar Nutriente em pó **(Vetec e Himedia)**.....23 g

H_2O qsp.....1000 mL

Ágar Fenilalanina

Ágar fenilalanina em pó **(Bencton Dickinson)**..... 23 g

H_2O qsp.....1000 mL

Ágar TSI

Ágar TSI em pó **(Himedia)**..... 65 g

H_2O qsp.....1000 mL

Ágar Citrato de Simmons

Ágar fenilalanina em pó **(Merck)**..... 40g

H_2O qsp.....1000 mL

MILi

Extrato de levedura **(Vetec)**.....0,6 g

Peptona **(Himedia)**.....2,0 g

Triptona **(Himedia)**.....2,0 g

L-lisina **(Inlab)**.....2,0 g

Glicose **(Himedia)**.....0,2 g

Ágar-ágar **(Vetec)**.....0,4 g

Púrpura de Bromocresol **(Reagen)**.....0,004 g

H_2O destilada qsp.....200 mL

Caldo VM/VP

Peptona em pó **(Himedia)**.....5g

K2HPO4 **(Quimilab)**.....5g

Glicose **(Himedia)**.....5g

H_2O destilada qsp.....1000 mL

Ágar Fenilalanina

Ágar fenilalanina em pó **(Bencton Dickinson)**.....23g

H_2O qsp.....1000 mL

Soluções para isolamento e identificação de *E. coli*

Reativo de Kovac's

Álcool isoamílico **(Dinâmica)**.....30 mL

p-dimetilaminobenzaldeído **(Vetec)**.....2 g

HCl concentrado **(Química Fina)**..... 10 mL

H_2O qsp.....1000 mL

Cloreto férrico ($FeCl_3$)

$FeCl_3$ em pó **(Vetec)**.....40g

H_2O destilada qsp.....100 mL

Vermelho de metila (VM)

Vermelho de metila **(Carlo Erba)**.....0,1 g

Etanol 95% **(Biotec)**.....300 mL

H_2O destilada qsp.....500 mL

Reagentes e soluções utilizados para o teste de aderência em cultura de células Hep-2

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Hepes 10% SFB (pH 7,4)

DMEM em pó para 1 litro **(Cultilab)**..... 1 frasco

Hepes **(Sigma)**.....3,5 g

NaHCO3 **(Merck)**.....0,2%

SFB **(Cultilab)**.....10%

H_2O deionizada.....qsp 1000 mL

Aferir o pH final = 7,4 e esterilizar por filtração

BSS livre de cálcio e Magnésio

Cloreto de sódio **(Merck)** .....8 g

Cloreto de potássio **(Merck)** .....0,4 g

Fosfato de sódio dibásico **(Vetec)** .....0,39 g

Sulfato de sódio **(Merck)** .....0,1 g

Fosfato de potássio **(Vetec)** .....0,15 g

Glicose **(Vetec)** .....1,1 g

Vermelho de Fenol **(Merck)**..... 2,5 mL

H_2O deionizada qsp.....1000 mL

pH final = 7,4

Esterilizar por filtração

Caldo BHI

BHI em pó **(Himedia)**..... 37 g

H_2O qsp.....1000 mL

<u>Reagentes e soluções utilizados nos ensaios de PCR</u>

Tampão Tris Borato-EDTA (TBE) 10 X

Tris hidroximetil amino metano **(Vetec)**.....121,14 g (1M)

Ácido bórico **(Proquimios)**.....61,83 g (1M)

EDTA **(Proquimios)**.....7,45 g (0,02M)

H_2O MilliQ qsp.....1000 mL

Dissolver em Banho-Maria 37ºC, aferir o pH para 8,4 e autoclavar. Guardar em geladeira. Para preparar TBE 0,5 X, adicionar 50 mL do TBE 10 X à 950 mL de H_2O destilada e

homogeneizar; e para preparar TBE 1X, adicionar 100 mL do TBE 10X à 900 mL de H_2O destilada e homogeneizar.

Loading

Azul de bromofenol **(Vetec)**.....0,05%

Sacarose **(Invitrogen)**.....40%

Lauril sulfato de sódio **(Sigma)**.....0,5%

EDTA **(Reagen)**..... 0,1 M pH8,0

Gel de agarose 2%

Agarose **(Pronadisa)**..... 2 g

TBE 1X qsp .....100 mL

Brometo de etídio (0,05%)

Brometo etídio (10mg/mL) **(Ameresco)**.....15 µL

H_2O destilada.....300 mL

<u>Soluções e corantes utilizados nos ensaios de formação de Biofilme</u>

PBS (Tampão-fosfato-salino) 0,2M

Solução A:

NaH2PO4.H2O **(Reagen)**.....2,76 g

H_2O destilada.....100 mL

Solução B:

$Na_2HPO_4.H_2O$ **(Carlo Erba)**.....5,365 g

H_2O destilada.....100 mL

Solução A.....14 mL

Solução B .....36 mL

NaCl **(Vetec)**.....8,5 g

H_2O destilda.....qsp. 1000 mL

pH final 7,2

Álcool 97% em éter

Etanol PA **(Biotec)**.....97 mL

Éter etílico PA **(Isofar)**.....3 mL

Salina

NaCl **(Vetec)**.....8,5 g

H_2O destilada.....qsp. 1000 mL

Caldo Luria Bertani (LB) (NAVES, DEL PRADO, *et al.*, 2008)

Triptona **(Difico)**.....10 g

Extrato de levedura **(Vetec)**.....5 g

NaCl **(Vetec)**.....5 g

Glicose **(Merck)**.....5 g

H_2O destilada qsp.....1000 mL

Safranina

Safranina **(Reagen)**.....0,1 g

H_2O destilada qsp.....100 mL

Soluções e corantes utilizados nos ensaios de formação de película

Caldo Mueller Hinton (MH)

Base Mueller Hinton em pó **(Difco)**……..……... 21g

H_2O destilada qsp..... 1000 mL

Reagentes e soluções utilizados nos ensaios de hibridização

Solução SSC 1X

NaCl **(Vetec)** .....0,15 M

Citrato de sódio **(Merck)**..... 0,015M

Solução de Denhardt 100X

Albumina de soro bovino..... 2% (p/v)

Ficoll..... 2% (p/v)

Polivinilpirrolidona (PVP)..... 2% (p/v)