

OCTAVIANA BACCIN FIALHO

**IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS
POR PCR-MULTIPLEX**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth

Co-Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

**CURITIBA
2008**

“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão... que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades a às pessoas, que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim... e que valeu a pena!”

(Luís Fernando Veríssimo)

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho marca o “fim” de uma etapa essencial e muito importante da minha vida, iniciada em 2001 com a graduação em farmácia. Agradecer a todas as pessoas que colaboraram para a construção desta dissertação não é uma tarefa nada simples de se fazer. O mais complicado deste ponto não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, àqueles que me ajudaram, de alguma forma, no meu percurso nesses dois anos agradeço imensamente.

A todas as pessoas que doaram suas amostras, que mesmo anonimamente, foram o alicerce deste projeto.

À Sônia Farah e ao Laboratório Central do Estado (LACEN), em especial pelas amostras.

Ao Laboratório Frischmann & Aisengart, em especial às Farmacêuticas Bioquímicas Dra. Kazuko e Dra. Ieda pela atenção, disposição e generosidade em ceder amostras.

À Dra. Kátia Aranda, da UNIFESP, pelos controles gentilmente cedidos.

Ao Departamento de Bioquímica. Agradeço ao Valter pelo auxílio na realização das seqüências, ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela co-orientação e colaboração para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. À mestrandia Carolina por ceder células para o ensaio.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Básica. Obrigada Profa. Giseli Klassen pela receptividade e paciência em me ensinar técnicas de cultivo celular, que até então era novidade para mim. À sua orientada Ednea pela ajuda no desenvolvimento do ensaio celular.

À Profa. Gisele Pesqueiro pela confiança em mim depositada ao ceder a carta de recomendação para a seleção do mestrado e pelas conversas e conselhos dados nas tardes de sextas-feiras.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas por proporcionar-me a chance de fazer o mestrado. À Regina pela atenção dada a mim todas as vezes que a procurei.

À UFPR, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Às “meninas” do laboratório Carol, Sílvia, Sônia, Cibelle, Mônica, Lauriane e Camila por toda ajuda e apoio durante o tempo de convivência que tivemos, seja nos tempos de estágio, monitoria e mestrado.

Aos colegas da turma de 2006 (Alisson, Ana Asbahr, Ana Melchiors, Ana Tomzack, Claudia, Cristina, Daniela Dall’Stella, Flávia, Juliano, Melissa, Priscila) pelas colaborações diretas e indiretas. Em especial à Melissa por toda amizade e apoio dados durante esses dois anos.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Cyntia, que me deu a primeira chance quando fui procurar um estágio. A partir daquele dia algo me dizia que esta “parceria” iria longe. Obrigada por ter aceitado a orientação de minha dissertação, pela confiança em mim depositada, por ser este exemplo de pessoa competente e profissional, pelos conhecimentos transmitidos, pelas críticas construtivas, pelo incentivo e paciência para com as minhas dificuldades. À você devo integralmente a realização dessa dissertação.

À todos meus amigos de faculdade e de infância que, de várias maneiras, sempre me apoiaram e me deram força para que eu pudesse cumprir mais etapa da minha vida.

Ao meu noivo Daniel, pelo incentivo nos momentos em que estive desanimada e pela compreensão durante este tempo em que estive distante.

À minha irmã Bruna, que sempre foi e sempre será o meu “tesourinho” e uma pecinha chave para que eu não desanime diante de todo e qualquer obstáculo que a vida possa colocar diante de mim.

Aos meus pais, Dora e Carlos Alberto, por todo apoio incondicional que me dedicaram e por nunca terem poupado esforços para que eu pudesse chegar até aqui. A eles meu eterno agradecimento.

A todos vocês, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 <i>E. coli</i> Enteropatogênica (EPEC).....	16
2.1.1 Principais fatores de virulência.....	17
2.1.1.1 Plasmídeo EAF.....	17
2.1.1.2 Intimina (<i>eae</i>).....	17
2.1.2 EPEC típica e EPEC atípica.....	18
2.1.3 Detecção.....	19
2.2 <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC).....	20
2.2.1 Principais fatores de virulência.....	21
2.2.1.1 Toxinas Shiga (Stx).....	21
2.2.1.2 Intimina (<i>eae</i>).....	22
2.2.1.3 Enterohemolisina (<i>ehxA</i>).....	23
2.2.1.4 STEC <i>autoagglutinating adhesin</i> (Saa).....	23
2.2.1.5 Subtilase (SubAB).....	24
2.2.2 Detecção.....	24
2.3 <i>E. coli</i> Enterotoxigênica (ETEC).....	25
2.3.1 Principais fatores de virulência.....	26
2.3.1.1 Toxinas termo-lábeis (LT).....	26
2.3.1.2 Toxinas termo-estáveis (ST).....	27
2.3.1.3 Antígenos de fator de colonização (CFA).....	28
2.3.1.4 Outros fatores de virulência.....	28
2.3.2 Detecção.....	29
2.4 <i>E. coli</i> Enteroinvasora (EIEC).....	29
2.4.1 Principais fatores de virulência.....	30
2.4.1.1 Antígeno plasmidial de invasão (<i>ipa</i>) e locus associado à invasão (<i>ial</i>).....	30
2.4.2 Detecção.....	31
2.5 <i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	31
2.5.1 Principais fatores de virulência.....	32
2.5.1.1 Plasmídeo de aderência agregativa (pAA).....	33
2.5.1.2 Fímbria de aderência agregativa (AAF).....	33
2.5.1.3 Outros fatores de virulência.....	33
2.5.2 Detecção.....	34

2.6 <i>E. coli</i> que Adere Difusamente (DAEC)	34
2.6.1 Principais fatores de virulência.....	35
2.6.1.1 Fímbria F1845.....	35
2.6.2 Detecção.....	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Amostra	38
4.2 Bactérias utilizadas como controles	38
4.3 Condições de cultivo	38
4.4 Triagem das culturas para presença de DEC	39
4.5 Extração de DNA	39
4.6 PCR	39
4.7 Detecção dos produtos de PCR	41
4.8 Determinação da especificidade do método	42
4.9 Isolamento e identificação de colônias de DEC	42
4.10 Caracterização bioquímica	42
4.11 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	44
4.12 Ensaio de citotoxicidade em células Vero	44
4.13 Determinação de genes de virulência acessórios de STEC	45
4.14 Seqüenciamento de DNA	45
4.15 Cálculo do índice de patogenicidade	46
4.16 Análises estatísticas	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Estabelecimento das condições de reação para PCR Multiplex	47
5.2 Determinação da especificidade do método	48
5.3 Triagem das culturas de fezes para a presença de DEC	48
5.3.1 Grupo controle.....	48
5.3.2 Indivíduos com diarréia.....	49
5.4 Isolamento e identificação das colônias de DEC	51
5.4.1 Grupo controle.....	51
5.3.2 Indivíduos com diarréia.....	52
5.5 Caracterização bioquímica	54
5.6 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	60
5.7 Ensaio de citotoxicidade em células Vero	64
5.8 Genes de virulência acessórios de STEC	64
5.9 Seqüenciamento dos amplicons	65
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	93
ANEXO - Aprovação do comitê de ética	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E	- lesões do tipo <i>Attaching and effacing</i>
AA	- Aderência agregativa
AAF	- Fímbria de aderência agregativa
AAF/I	- Fímbria de aderência agregativa I
AAF/II	- Fímbria de aderência agregativa II
aEPEC	- EPEC atípicas
AfaE-I	- Adesina não fimbrial I
AfaE-II	- Adesina não fimbrial II
AggR	- Ativador transcricional
<i>astA</i>	- Gene da toxina termo-estável de <i>E. coli</i> enteroagregativa 1
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BFP	- <i>Bundle-forming pilus</i>
CFA	- Antígenos de fator de colonização
UFC	- Unidade formadora de colônia
cGMC	- Guanina monofosfato cíclico
CHO	- Célula de ovário de hamster chinês
ClyA	- Citotoxina formadora de poro
CVD432	- Plasmídeo de aderência agregativa
DA	- Aderência difusa
DaaE	- Adesina fimbrial
DAEC	- <i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DAF	- <i>Decay-acceleration factor</i>
DEC	- <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
EAEC	- <i>Escherichia coli</i> de enteroagregativa
EAF	- Fator de aderência da EPEC
EAST1	- Toxina termo-estável de <i>E. coli</i> enteroaderente 1
EatA	- Autotransportador da ETEC
EIEC	- <i>Escherichia coli</i> de enteroinvasora
EPEC	- <i>Escherichia coli</i> de enteropatogênica
F1845	- Adesina fimbrial 1845
HC	- Colite hemorrágica
HUS	- Síndrome hemolítica urêmica
IL-8	- Interleucina 8
LA	- Padrão de aderência localizada
LAL	- Padrão de adesão <i>LA-like</i>
LEE	- <i>Locus of enterocyte effacement</i>
LT	- Toxina termo-lábil
LT-I	- Toxina termo-lábil I
LT-II	- Toxina termo-lábil II
NCCLS	- <i>National Comitee for Clinical Laboratory Standards</i>
ng	- Nanograma
pAA	- Plasmídeo de aderência agregativa
pb	- Pares de base
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pet	- Toxina codificada por plasmídeo
PMN	- Leucócito polimorfonuclear

pmol	- Picomol
REPEC	- EPEC isolada de coelho
RTX	- <i>Repeats in toxin</i>
Saa	- STEC <i>autoagglutinating adhesin</i>
ShET1	- Enterotoxina <i>Shigella</i> 1
SPATES	- Autotransportadores da <i>Enterobacteriaceae</i>
ST	- Toxina termo-estável
<i>st</i>	- Gene da toxina termo-estável
Sta	- Toxina termo-estável a
Stb	- Toxina termo-estável b
STEC	- <i>Escherichia coli</i> Shiga toxigênica
Stx	- Toxina Shiga
Stx1	- Toxina Shiga 1
Stx2	- Toxina Shiga 2
SubAB	- Citotoxina subtilase
tEPEC	- EPEC típicas
TSB	- Caldo tripticaseína de soja

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FICHA DE INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO API20E.....	43
FIGURA 2 -	PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS DAS DEC.....	47
FIGURA 3 -	DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO MÉTODO.....	48
FIGURA 4 -	PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO REPRESENTATIVO DAS ESTIRPES DE DEC ENCONTRADAS.....	50
FIGURA 5 -	PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA ACESSÓRIOS DE STEC.....	64
FIGURA 6 -	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE aEPEC 3CS, 49D, 65CS E 78CS COM O GENE DA INTIMINA IOTA DE <i>E. coli</i> ESTIRPE 1252-59.....	66
FIGURA 7 -	ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DO AMPLICON DE aEPEC 200D COM O GENE DA INTIMINA MU DE <i>E. coli</i> ESTIRPE MA 551/1.....	68
FIGURA 8 -	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE aEPEC 94CS, 216D E 225CS COM O GENE DA INTIMINA DE <i>E. coli</i> ESTIRPE DG 161/4.....	69
FIGURA 9 -	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE aEPEC 128CS E 172D COM O GENE DA INTIMINA BETA DE <i>E. coli</i> ESTIRPE CK 379.....	70
FIGURA 10 -	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE aEPEC 85D, 132CS, 190D, 213D E 237D COM O GENE DA INTIMINA THETA DE <i>E. coli</i> ESTIRPE DEC 8b.....	71
FIGURA 11 -	ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DO AMPLICON DE aEPEC 86D COM O GENE DA INTIMINA GAMA DE <i>E. coli</i> ESTIRPE ECOR 37.....	72
FIGURA 12 -	ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DO AMPLICON DE aEPEC 28D COM O GENE DA INTIMINA EPSILON DE <i>E. coli</i>	73
FIGURA 13 -	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE EIEC/ <i>Shigella</i> COM O GENE <i>ipaH</i> DE <i>Shigella</i>	74
FIGURA 14 -	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE EIEC/ <i>Shigella</i> COM O GENE <i>ial</i> DE <i>Shigella</i>	76
FIGURA 15 -	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE EAEC COM UMA REGIÃO DO PLASMÍDEO CVD 432 UTILIZADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE <i>E. coli</i> ENTEROAGREGATIVA.....	78
FIGURA 16 -	ALINHAMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS DAS AMOSTRAS 77CS e 133D, COM A REGIÃO CORRESPONDENTE O GENE <i>daaE</i>	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO CONTROLES.....	39
TABELA 2 -	INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS COM AS DEC.....	40
TABELA 3 -	PROGRAMA UTILIZADO PARA PCR - SISTEMA 1.....	41
TABELA 4 -	PROGRAMA UTILIZADO PARA PCR - SISTEMA 2.....	41
TABELA 5 -	PATOTIPOS DE DEC ISOLADOS DE AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE.....	51
TABELA 6 -	PATOTIPOS DE DEC ISOLADOS DE AMOSTRAS DIARRÉICAS E IDADE DOS INDIVÍDUOS COM DIARRÉIA.....	53
TABELA 7 -	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS DEC ISOLADAS DO GRUPO CONTROLE.....	55
TABELA 8 -	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS DEC ISOLADAS DOS INDIVÍDUOS COM DIARRÉIA.....	57
TABELA 9 -	PERFIL BIOQUÍMICO DAS ESTIRPES DE DEC.....	59
TABELA 10 -	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO GRUPO CONTROLE.....	61
TABELA 11 -	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DOS DOENTES.....	62
TABELA 12 -	PADRÕES DE RESISTÊNCIA OU DE RESPOSTA INTERMEDIÁRIA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS AOS ANTIMICROBIANOS.....	63
TABELA 13 -	FREQÜÊNCIA DOS PATOTIPOS DE <i>Escherichia coli</i> DIARREIOGÊNICAS EM INDIVÍDUOS COM E SEM DIARRÉIA E ÍNDICE DE PATOGENICIDADE.....	65
TABELA 14 -	SEQÜÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE <i>eae</i> (aEPEC).....	66
TABELA 15 -	SEQÜÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE EIEC/ <i>Shigella ipaH</i>	74
TABELA 16 -	SEQÜÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE EIEC/ <i>Shigella ial</i>	75
TABELA 17 -	SEQÜÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE EAEC.....	77
TABELA 18 -	SEQÜÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE DAEC.....	81

RESUMO

Escherichia coli diarréiogênicas (DEC) são uma importante causa de doenças gastrointestinais. As DEC são classificadas em 6 grupos de acordo com a presença de genes de virulência: a *E. coli* enteropatogênica possui os genes *eae* e *bfpA*, os quais codificam adesinas; *E. coli* produtora de toxina Shiga possui os genes *stx*₁ e/ou *stx*₂, que codificam para toxinas Shiga; *E. coli* enterotoxigênica possui os genes *lt* e/ou *st*, que codificam para as toxinas LT e ST, respectivamente; *E. coli* enteroinvora possui os genes *ial/ipaH*, que estão associados com invasão; *E. coli* enteroagregativa que possui o plasmídeo de virulência CVD432 e a *E. coli* de aderência difusa que possui o gene *daaE* que codifica uma fímbria. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar estirpes de DEC a partir de culturas de amostras fecais de pessoas com diarreia e de pessoas saudáveis. Foi realizada triagem para DEC em 500 amostras (250 de indivíduos saudáveis e 250 de indivíduos com diarreia) utilizando PCR-Multiplex. Estirpes de DEC foram isoladas em igual proporção (7,6%) do grupo controle e dos indivíduos com diarreia. Os seguintes patótipos de DEC foram isolados: no grupo controle - EAEC (3,2%), aEPEC (2,8%), STEC (1,2%) e DAEC (0,4%); nos indivíduos doentes – aEPEC (4%), EAEC (2,4%), STEC, DAEC e EIEC (0,4%); duas *Shigella sonnei* (0,8%) também foram isoladas. Nenhuma DEC foi associada significativamente com diarreia. Três das quatro STEC mostraram resultados positivos no ensaio de citotoxicidade em células Vero. Foi encontrada elevada proporção de DEC com resistência a um ou mais antimicrobianos. O protocolo de PCR-Multiplex utilizado mostrou ser sensível e específico para DEC/*Shigella*.

ABSTRACT

Diarrheagenic *E. coli* (DEC) strains are an important cause of gastrointestinal disease. DEC are classified according to the presence of virulence genes: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) contains genes *eae* and *bfpA* which codify for adhesins; Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) contains *stx₁* and/or *stx₂*, which codify for Shiga toxins; Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) contains *lt* and/or *st*, that codify for LT or ST toxins, respectively; Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) contains *ial/ipaH* which are associated with invasion; Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) contains the virulence plasmid CVD432 and Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) contains *daaE* which codifies a fimbriae. The aim of this work was to screen stool specimens for presence of DEC and identify and characterize the strains. Five hundred stool specimens (250 patients with diarrhea and 250 healthy controls) were screened for DEC using a Multiplex-PCR protocol. Frequency of DEC strains was the same (7,6%) for healthy controls and patients with diarrhea. The following patotypes were found in the control group: EAEC (3,2%), aEPEC (2,8%), STEC (1,2%) and DAEC (0,4%); and for the patients with diarrhea: aEPEC (4%), EAEC (2,4%), STEC, DAEC and EIEC (0,4%). Two strains of *Shigella sonnei* (0,8%) were also found. No one DEC was significantly associated with diarrhea. Three out of four STEC were positive in the Vero cell assay. A high number of DEC strains were resistant to one or more of the antimicrobials tested. The Multiplex-PCR protocol used show to be sensitive and specific for DEC/*Shigella*.

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli é o anaeróbio facultativo predominante na microbiota do trato intestinal humano. Estas *E. coli* comensais raramente causam doença, exceto nos indivíduos imunocomprometidos ou quando as barreiras gastrointestinais são rompidas. Entretanto, há várias estirpes de *E. coli* que adquiriram atributos de virulência específicos (patotipos) que lhes conferem a habilidade de causar um amplo espectro de doenças. Esses fatores de virulência são freqüentemente codificados em elementos genéticos que podem ser transferidos para diferentes estirpes e assim, criar novas combinações algumas das quais estão associadas com patotipos específicos de *E. coli* que são capazes de causar doenças em indivíduos saudáveis (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). As estirpes de *E. coli* patogênicas causam basicamente três síndromes clínicas: infecção do trato urinário, sepse/meningite e diarreia (NATARO e KAPER, 1998).

As doenças diarreicas permanecem como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (FARTHING, 2000; WANKE, 2001). Estima-se que ocorram, por ano, cerca de 4 bilhões de casos de diarreia aguda em todo o mundo, resultando na morte de 3 a 4 milhões de pessoas. Embora as implicações dessa doença sejam particularmente evidentes nos países em desenvolvimento, onde a diarreia aguda é a segunda causa mais comum de mortes de crianças, ficando atrás apenas de doenças respiratórias agudas (KOSEK, BERN e GUERRANT, 2003), nos países industrializados a diarreia aguda também causa morbidade e mortalidade significativas (FARTHING, 2000).

As *E. coli* diarreogênicas (DEC) contribuem significativamente para os casos de diarreia, e os sintomas das infecções causadas por estes organismos variam de diarreia aquosa auto-limitada a complicações potencialmente fatais (KESKIMAKI *et al.*, 2001; WANKE, 2001). Com base na patogênese, manifestações clínicas e presença de fatores de virulência específicos, as DEC são atualmente classificadas em 6 categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroaderente (EAEC)

e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998). Esses patótipos de *E. coli* estão entre as causas importantes de diarreia e constituem um dos principais problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998).

O diagnóstico das DEC é dificultado pelo fato de que esses organismos não podem ser identificados com base somente em critérios bioquímicos uma vez que geralmente são indistinguíveis das *E. coli* não patogênicas. A diferenciação entre os patótipos de *E.coli* requer o uso de ensaios imunológicos, cultivo celular ou técnicas moleculares (NATARO e KAPER, 1998; WATTERWORTH *et al.*, 2005). Neste trabalho a presença de DEC, em amostras de fezes, foi investigada utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase para a detecção dos genes de virulência que caracterizam cada patótipo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Escherichia coli faz parte da família *Enterobacteriaceae*, composta por bacilos gram negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glucose. Desenvolve-se bem em meios de cultura utilizados na rotina laboratorial como MacConkey e Teague (NATARO *et al.*, 2007).

Devido à similaridade com as *E. coli* não-patogênicas normalmente encontradas nas fezes, as *E. coli* diarreio gênicas (DEC) não podem ser identificadas com base somente nas características bioquímicas. A classificação sorológica, que utiliza anticorpos contra os antígenos da superfície bacteriana, é o método geralmente utilizado nos laboratórios clínicos para identificar algumas das estirpes de DEC (SILVA, 2006). Dois tipos principais de antígenos de superfície constituem a base para a classificação sorológica, o antígeno 'O' ou somático que define o sorogrupo, e o antígeno 'H' ou flagelar. Os antígenos O e H definem o sorotipo. Embora alguns sorogrupos específicos de *E. coli* estejam associados com certas síndromes clínicas, servindo como marcadores que se correlacionam com clones virulentos, não são estes marcadores que conferem virulência (NATARO e KAPER, 1998).

Mais recentemente foi proposto um sistema de classificação baseado nos fatores de virulência, que podem ser identificados utilizando métodos moleculares como hibridização de DNA, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou cultivo celular. A vantagem deste sistema é que está mais diretamente associado com o processo de doença do que a sorotipagem (SALYERS e WHITT, 2002).

As DEC estão entre os primeiros patógenos para os quais foram desenvolvidos métodos diagnósticos moleculares, que são os mais confiáveis para diferenciar as estirpes diarreio gênicas dos membros não-patogênicos da microbiota intestinal e para distinguir uma categoria da outra (NATARO e KAPER, 1998), permitindo um diagnóstico mais acurado através da identificação de genes de virulência. Entretanto, além das *E. coli* diarreio gênicas, outros microrganismos também são capazes de causar diarreia, entre eles estão: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Giardia lamblia*,

Cryptosporidium sp., *Entamoeba* e vírus como o Rotavírus entre outros (LANATA e MENDOZA, 2002).

A seguir serão apresentados os principais mecanismos de virulência associados com as estirpes diarreiogênicas de *E.coli*.

2.1 *E. coli* Enteropatogênica (EPEC)

EPEC foi o primeiro grupo de *E. coli* reconhecido como causa de diarreia, em 1945, quando John Bray descreveu estirpes sorologicamente distintas que foram isoladas de crianças com diarreia, mas não de crianças saudáveis (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Essas bactérias causam doença primariamente em crianças menores de 2 anos de idade. Uma hipótese proposta para explicar a razão da resistência relativa de adultos e crianças mais velhas é a perda de receptores específicos com a idade (NATARO e KAPER, 1998).

EPEC é a principal causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento. Nos países industrializados a frequência desses organismos decresceu, mas eles continuam a ser uma causa importante de diarreia (KESKIMAKI *et al.*, 2001; TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002). No Brasil EPEC é o grupo de *E. coli* diarreiogênica isolado com maior frequência (FRANZOLIN *et al.*, 2005; GIRÃO *et al.*, 2006).

Diarreia aquosa e profusa, vômito e febre baixa são sintomas comuns da infecção por EPEC. Leucócitos fecais, que são um achado característico de bactérias invasoras, não são observados em pacientes infectados por EPEC (MILLER *et al.*, 1994). Na mucosa intestinal ocorre a formação da lesão do tipo A/E, associada com o desarranjo do sistema enzimático digestivo-absortivo, levando a má absorção dos nutrientes (FAGUNDES-NETO, 1996). Como acontece com outras estirpes de DEC, a transmissão de EPEC é fecal-oral, através de mãos, alimentos e fômites contaminados (NATARO e KAPER, 1998).

2.1.1 Principais fatores de virulência

2.1.1.1 Plasmídeo EAF

As estirpes de EPEC geralmente exibem um padrão de aderência específico em células HeLa e Hep-2, que é dependente da presença do plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*). Esse plasmídeo contém um grupamento de 13 genes que são requeridos para a expressão tanto do BFP quanto da intimina (NATARO e KAPER, 1998).

Ao invés de cobrir uniformemente as células, as EPEC se ligam em determinadas áreas da superfície celular e formam grumos compactos, um padrão conhecido como aderência localizada (LA). O principal fator responsável pela aderência localizada é um tipo de pili denominado *bundle-forming pilus* (BFP), codificado no plasmídeo EAF, que interconecta as bactérias formando grumos ou microcolônias e promove a sua estabilização (DONNENBERG e WHITTAM, 2001; TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

2.1.1.2 Intimina

O mecanismo central da infecção causada por EPEC é a formação de lesões intestinais denominadas *attaching and effacing* (A/E), causadas pela habilidade da bactéria aderir intimamente aos enterócitos, destruir as microvilosidades e induzir alterações no citoesqueleto incluindo o acúmulo de actina polimerizada e a formação de estruturas em pedestal nos locais onde a bactéria adere (DONNENBERG e WHITTAM, 2001; TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

A formação da lesão A/E depende da expressão de vários genes localizados em uma região de 35 kb do cromossomo de EPEC, denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) (MCDANIEL *et al.*, 1995; FRANKEL *et al.*, 1998). LEE é considerada uma ilha de patogenicidade porque contém vários genes associados com virulência, e não é encontrada em estirpes de *E. coli* não patogênicas (DONNENBERG e WHITTAM,

2001). Seqüências homólogas à LEE das EPEC são encontradas em outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* que causam a lesão do tipo A/E, incluindo STEC, RDEC-1 (bactéria que causa diarreia em coelho), *Hafnia alvei* e *Citrobacter rodentium* (NATARO e KAPER, 1998).

Intimina é uma proteína de membrana externa necessária para a formação das lesões A/E. É codificada pelo gene *eae* presente na LEE (JERSE *et al.*, 1990). A intimina é responsável pela adesão íntima da EPEC às células epiteliais através da ligação com o receptor Tir (*translocated intimin receptor*), que é sintetizado pela bactéria, translocado pelo sistema de secreção tipo III codificado pela LEE e inserido na membrana citoplasmática da célula hospedeira (DONNENBERG e WHITTAM, 2001). O plasmídeo EAF não é essencial para a formação das lesões A/E, mas aumenta a eficiência da formação das mesmas (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

O modelo para a patogênese de EPEC indica que a bactéria inicialmente adere às células epiteliais através de uma adesina cuja identidade ainda não foi estabelecida. O sistema de secreção tipo III codificado pela LEE é ativado e várias proteínas efetoras incluindo Tir, são translocadas para o interior da célula hospedeira. EPEC então liga-se à célula hospedeira através da interação da intimina com Tir inserido na membrana, e numerosas proteínas do citoesqueleto acumulam-se sob o local onde a bactéria está ligada. As proteínas translocadas ativam vias de transdução de sinal nas células eucarióticas, e a diarreia provavelmente resulta de múltiplos mecanismos, incluindo a secreção ativa de íons, permeabilidade aumentada, perda da superfície absorptiva resultante da destruição das microvilosidades (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

2.1.2 EPEC típica e EPEC atípica

Em 1995, durante o Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC, foi aprovada a seguinte definição de EPEC “estirpes diarreogênicas de *E. coli* que produzem uma lesão característica denominada *attaching and effacing* (A/E) nas células intestinais e que não produzem toxinas Shiga. As EPEC típicas de origem humana possuem o plasmídeo de virulência EAF que codifica o *bundle-forming pilus* (BFP), necessário para

a adesão localizada (LA) em células epiteliais, e um complexo regulador de vários genes de virulência, enquanto as EPEC atípicas (aEPEC) não possuem este plasmídeo”.

Enquanto as estirpes típicas apresentam exibem somente aderência LA, as aEPEC geralmente apresentam um padrão de aderência denominado *LA-like* (LAL), caracterizado por microcolônias de bactérias menos compactas e menos densas que o LA. Entretanto essas estirpes também podem apresentar aderência difusa (DA) e agregativa (AA) (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002). Recentemente foram descritas estirpes de aEPEC que apresentam o padrão LA de adesão, mas a estrutura que media a agregação bacteriana nas microcolônias não é conhecida (HERNANDES *et al.*, 2006).

As EPEC típicas correspondem aos sorotipos clássicos de EPEC e são causas importantes de diarreia em países em desenvolvimento, mas raras nos países industrializados, onde as atípicas são a principal causa de diarreia (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004). No Brasil até a década de 90 uma elevada frequência de EPEC típica era observada, no entanto, estudos recentes têm demonstrado aumento na frequência da aEPEC como causa de diarreia (FRANZOLIN *et al.*, 2005).

2.1.3 Detecção

As EPEC podem ser isoladas através de cultura em meios seletivos, e detectadas através da aglutinação com anticorpos contra o antígeno somático. Cinco a dez colônias lactose positivas de *E. coli* devem ser investigadas utilizando anticorpos específicos para os antígenos somáticos associados com EPEC. Estirpes que aglutinam com estes anticorpos devem ser confirmadas por laboratórios de referência através da determinação do antígeno H, para a sorotipagem completa (GRAY, 1995). Os principais sorotipos de EPEC encontrados são: O55:[H6], O86:H34, O111:[H2],a O114:H2, O119:[H6], O127:H6, O142:H6, O142:H34 (típicas) e O26:H[11], O55:[H7],

O55:H34, O86:H8, O111ac:[H8], O111:[H9], O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2 (atípicas) (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

O fenótipo das lesões A/E pode ser identificado através de cultura de células HEp-2 ou HeLa e através da análise da biópsia intestinal. Testes moleculares utilizando hibridização de DNA ou PCR estão disponíveis para o diagnóstico de EPEC, e tem como alvo a detecção do gene *eae* que codifica a intimina e marcadores do plasmídeo EAF além de verificar a ausência de genes que codificam a toxina Shiga (NATARO e KAPER, 1998). A diferenciação entre aEPEC e tEPEC é realizada através da detecção do gene *bfp*, uma vez que este gene está presente somente das estirpes de tEPEC.

2.2 *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

STEC foi reconhecida como patógeno humano em 1982, durante a investigação de dois surtos de colite hemorrágica que foram associados a um sorotipo então incomum de *E. coli* identificado como O157:H7 (RILEY *et al.*, 1983). Outro trabalho de destaque, também publicado em 1983, relatou a associação de casos esporádicos de síndrome hemolítica urêmica com estirpes de *E. coli* produtoras de citotoxinas (KARMALI *et al.*, 1983). Logo após verificou-se que a toxina produzida pela *E. coli* O157:H7 era relacionada àquela produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1 e ela passou a ser denominada toxina Shiga (TARR, GORDON e CHANDLER, 2005). Atualmente além da *E. coli* O157:H7, são reconhecidos mais de 200 sorotipos diferentes de STEC, designadas como STEC não-O157, capazes de causar doenças em humanos (MICROBIONET, 2008).

As STEC são caracterizadas pela produção de toxina Shiga e são uma causa importante de doença gastrointestinal em humanos, não só pelos inúmeros surtos que provocam (KARCH *et al.*, 1999; CDC, 2006; CDC, 2007), mas também porque podem causar complicações graves como colite hemorrágica (CH), síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PATON e PATON, 1998; TARR, GORDON e CHANDLER, 2005). A morbidade e a mortalidade associadas aos surtos e

casos esporádicos de doenças gastrointestinais causados por STEC, tornaram este microrganismo um problema mundial de saúde pública (PATON e PATON, 1998).

Os principais reservatórios de STEC são o gado e outros ruminantes, aparentemente saudáveis, que contém STEC na microbiota intestinal (BEUTIN *et al.*, 1993). A infecção de humanos com STEC ocorre principalmente através da ingestão de água e alimentos contaminados tais como leite e carne, e seus derivados, verduras cruas, sucos não pasteurizados (TARR, GORDON e CHANDLER, 2005; CDC, 2006).

2.2.1 Principais fatores de virulência

2.2.1.1 Toxinas Shiga (Stx)

A toxina Shiga é o principal fator de virulência das STEC, responsável pelas principais manifestações da colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (PATON, e PATON, 1998; TARR, GORDON e CHANDLER, 2005). Pertencem à família das toxinas do tipo AB e são codificadas em operons que têm uma estrutura comum, onde a região que codifica a subunidade A precede a da subunidade B (HABIB e JACKSON, 1993). As toxinas Shiga são compostas por uma subunidade A e cinco subunidades B. A subunidade A é responsável pela toxicidade e tem atividade de RNA-*N*-glicosidase. A subunidade B é responsável pela ligação da toxina ao receptor Gb3 presente na superfície das células do hospedeiro. Uma vez ligada à célula alvo, a subunidade A é internalizada por endocitose e quebra uma ligação *N*-glicosídica específica na subunidade 28S do rRNA, removendo um resíduo de adenina, inibindo o processo de síntese de proteínas e causando morte celular (ENDO *et al.*, 1988; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). As toxinas Shiga são produzidas no intestino mas podem causar complicações sistêmicas através de uma combinação de toxicidade direta e indução da produção de citocinas (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; TARR, GORDON e CHANDLER, 2005).

Existem dois grupos principais de toxinas Shiga, Stx1 e Stx2, classificados inicialmente com base nas suas propriedades imunológicas. Essas toxinas são

codificadas pelos genes *stx*₁ e *stx*₂, respectivamente. Stx1 é praticamente idêntica a Stx produzida pela *Shigella dysenteriae* do tipo 1 e reage cruzado com anticorpos anti Stx. Stx2 é imunologicamente diferente da Stx1, não reage com anticorpos anti-Stx1, embora essas toxinas sejam biologicamente e estruturalmente similares. A diferença entre Stx1 e Stx é de apenas um aminoácido na subunidade A, enquanto que Stx2 apresenta 56% de similaridade na seqüência de aminoácidos com as duas outras toxinas (JACKSON *et al.*, 1987; PATON, J. C. e PATON, A. W., 1998). As estirpes de STEC que produzem Stx2 são mais comumente associadas a doenças severas, como SHU, do que aquelas que produzem somente Stx1 ou Stx1 associada a Stx2 (SIEGLER *et al.*, 2003).

Variantes de Stx1 e Stx2 foram descritas. O grupo Stx1 apresenta poucas variantes que diferem discretamente na seqüência de nucleotídeos, sem conseqüências sobre as suas características antigênicas e toxicidade (PATON, BEUTIN e PATON, 1995; ZHANG *et al.*, 2002; MAINIL e DAUBE, 2005). Para Stx2 cerca de 20 variantes, que diferem mais em termos de seqüência de nucleotídeos, antigenicidade e toxicidade, foram descritas (NAKAO *et al.*, 2002; MAINIL e DAUBE, 2005). Algumas, como Stx2 e Stx2c, estão associadas principalmente com doença mais severa como CH e SHU, enquanto outras são encontradas apenas em casos de diarreia ou em amostras de origem animal (FRIEDRICH *et al.*, 2002; MAINIL e DAUBE, 2005).

Além das toxinas Shiga outros atributos de virulência podem ser produzidos pelas STEC mas, diferente do que ocorre com Stx, estes apresentam uma distribuição heterogênea.

2.2.1.2 Intimina (*eae*)

Algumas estirpes de STEC compartilham com a EPEC a capacidade de causar as lesões do tipo A/E na mucosa intestinal, também contêm o *locus of enterocyte effacement* (LEE) e conseqüentemente o gene *eae* que codifica a intimina. A LEE encontrada nas estirpes de STEC apresenta 93,9% de homologia na seqüência de nucleotídeos com àquela presente na EPEC, e o gene *eae* destes dois patótipos

apresentam 87,2% de identidade (FRANKEL *et al.*, 1998). Recentemente foi descrita a existência de ao menos 10 subtipos de intimina, mas a importância dessas variantes na patogênese não é conhecida (ZHANG *et al.*, 2002).

A intimina e a toxina Stx2 são os fatores de virulência que estão associados mais freqüentemente com estirpes de STEC isoladas de humanos, particularmente com as doenças severas como a SHU (BOERLIN *et al.*, 1999). No entanto, a presença da LEE não é essencial para a patogenia da STEC, pois um grande número de casos de doenças, incluindo SHU, tem sido causadas por estirpes LEE negativas (PATON *et al.*, 1999).

2.2.1.3 Enterohemolisina

A enterohemolisina é uma toxina codificada pelo gene *ehxA* presente em um plasmídeo encontrado em quase todas as estirpes de *E. coli* O157:H7 e é extensamente distribuído nas estirpes de STEC não-O157 (SCHMIDT, BEUTIN e KARCH, 1995; KARCH *et al.*, 2001). Pertence à família das toxinas RTX (*repeats in toxin*), e apresenta repetições em *tandem* de um nonapeptídeo. A produção de enterohemolisina também tem sido associada com doenças de maior severidade, mas a maneira como contribui para a patogênese da STEC ainda não é bem compreendida. Uma possibilidade é que a liberação da hemoglobina, devido a lise dos eritrócitos, sirva como fonte de ferro estimulando o crescimento do microrganismo (BAUER e WELCH, 1996).

2.2.1.4 STEC *autoagglutinating adhesin* (Saa)

Uma adesina denominada Saa, codificada pelo gene *saa*, foi descrita em algumas estirpes de STEC que não contêm a ilha de patogenicidade LEE. Tais estirpes foram isoladas de pessoas com SHU (PATON *et al.*, 2001). Entretanto, posteriormente verificou-se que a presença do gene *saa* é mais freqüente em estirpes isoladas de bovinos do que de humanos, sugerindo que Saa tenha um papel na adesão ao intestino

destes animais (JENKINS *et al.*, 2003). Portanto o papel da Saa na patogenia das STEC ainda está por ser esclarecido.

2.2.1.5 Subtilase (SubAB)

Recentemente, descobriu-se que a STEC 98NK2 (O113:H21), isolada de surto de SHU, produz uma citotoxina adicional, previamente descrita como AB₅ citotoxina, que é letal para camundongos, provocando danos microvasculares, trombose e necrose em múltiplos órgãos, incluindo cérebro, rins e fígado. Essa toxina foi denominada de citotoxina subtilase (SubAB). A subunidade A tem atividade catalítica e é uma subtilase tipo serina protease distantemente relacionada à toxina produzida pelo *Bacillus anthracis*. A subunidade B, assim como as Stx, forma um pentâmero que é responsável pela ligação a glicolípídeos na superfície das células alvo. Esta citotoxina é codificada por dois genes cotranscritos (*subA* e *subB*) localizados num plasmídeo de virulência, designado pO113. SubAB também foi detectada em estirpes de STEC de outros sorotipos (PATON *et al.*, 2004).

2.2.2 Detecção

Um dos primeiros testes desenvolvidos para o diagnóstico das STEC foi o MacConkey sorbitol, baseado na inabilidade do sorotipo O157:H7 utilizar o sorbitol. Entretanto, à medida que foi se verificando que havia outros sorotipos de STEC, que predominam em várias regiões do mundo, e que são capazes de fermentar o sorbitol, outras características passaram a ser utilizadas para a sua detecção.

O ensaio de citotoxicidade em células VERO (células de rim de macaco verde), baseado no efeito citopático produzido pelas toxinas Shiga, é o método de referência para o diagnóstico de STEC, mas não é prático para uso na rotina laboratorial. Diversos kits diagnósticos que utilizam anticorpos anti-Stx para detectar a presença de toxina Shiga estão comercialmente disponíveis. Entretanto, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a metodologia atualmente recomendada para a detecção das

STEC devido a sua especificidade, sensibilidade e rapidez em comparação aos métodos tradicionais (PATON e PATON, 1998; KARCH *et al.*, 2001). A reação positiva para os genes *stx*₁ e *stx*₂ é suficiente para confirmar a presença de STEC em uma amostra, mas a detecção de genes de virulência acessórios, que são aleatoriamente distribuídos entre as STEC, fornece uma informação relevante para a clínica, e pode ter um grande valor epidemiológico (PATON e PATON, 2005).

2.3 *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC)

As ETEC são estirpes de *E. coli* que produzem toxina termolábil (LT) e/ou termoestável (ST). Podem expressar somente LT, somente ST ou ambas. Foram descritas por De e colaboradores em 1956 quando, ao infectar coelhos com estirpes de *E. coli* isoladas de crianças e adultos com sintomas parecidos aos da cólera, observaram o acúmulo de fluidos no intestino dos animais, efeito similar ao provocado pelo *Vibrio cholerae* (QADRI *et al.*, 2005).

As ETEC são uma importante causa de diarreia nos países em desenvolvimento, particularmente em crianças, e são a principal causa da “diarreia do viajante” (NATARO *et al.*, 2007). Estão distribuídas numa grande variedade de sorogrupos, que abrangem pelo menos 78 grupos O e 34 H. Os sorogrupos O mais comuns são O6, O8, O15, O20, O25, O27, O49, O63, O78, O128, O148, O153, O159, O167 e O169, sendo os grupos O e H mais fortemente associados O8:H9, O78:H12 e O25:H42 (MERSON *et al.*, 1979; WOLF, 1997; NATARO *et al.*, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde, ETEC é o enteropatógeno mais frequentemente isolado de casos de diarreia em crianças com menos de 5 anos de idade em países em desenvolvimento, causando cerca de 210 milhões de episódios de diarreia e, aproximadamente 380.000 óbitos registrados anualmente (WHO, 1999).

A transmissão da ETEC ocorre através do consumo de água e alimentos contaminados (NATARO e KAPER, 1998).

ETEC causa diarreia aquosa do tipo secretória que varia de branda, auto-limitada, a severa. A doença se inicia com fezes aquosas e sem sangue, ausência de vômito,

levando à desidratação devido à perda de líquido e eletrólitos nas fezes. A perda de líquido resulta em boca seca, letargia, diminuição da pressão sangüínea, espasmos musculares e, nos casos mais severos, choque. Os pacientes infectados não apresentam febre. A diarréia dura em torno de 3 a 4 dias e é auto-limitada, se a hidratação for mantida os pacientes sobrevivem sem nenhuma seqüela. Com o tratamento adequado a taxa de mortalidade é extremamente baixa, menos de 1%. Entretanto as infecções por ETEC são difíceis de se diagnosticar, o que faz com que esta bactéria seja sub-diagnosticada (QADRI *et al.*, 2005).

2.3.1 Principais fatores de virulência

2.3.1.1 Toxinas termo-lábeis (LT)

São toxinas oligoméricas intimamente relacionadas em estrutura e função com a toxina da cólera (CT) produzida pelo *Vibrio cholerae*. Essas duas toxinas apresentam 80% de identidade nas suas seqüências de aminoácidos. Contém uma subunidade A, responsável pela atividade enzimática da toxina, e cinco subunidades B idênticas, que mediam a ligação da holotoxina aos gangliosídeos GM1 e GD1b da superfície celular (SIXMA *et al.*, 1993; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Existem duas categorias de LT, LT-I e LT-II, que não reagem cruzado em testes imunológicos. LT-I é encontrada predominantemente em estirpes isoladas de humanos e apresenta maior similaridade com a toxina da cólera, com aproximadamente 80% de identidade na seqüência de aminoácidos da CT. LT-II é encontrada principalmente em *E. coli* isoladas de animais e raramente em isolados de humanos (NATARO e KAPER, 1998).

Após a colonização do intestino delgado pela ETEC e a liberação da LT, a toxina se liga irreversivelmente aos receptores na superfície dos enterócitos e a subunidade A, que tem atividade de ADP-ribosil-transferase, é internalizada e transfere o ADP-ribosil do NAD para a proteína G, que regula a adenilciclase. Este processo resulta na ativação permanente da adenilciclase e no aumento dos níveis de AMPc intracelular o que estimula a secreção de cloreto e inibe a captação de NaCl. O desequilíbrio de íons

resulta na perda de água e diarreia. LT também afeta a síntese de prostaglandinas e leucotrienos que estimulam o transporte de eletrólitos e podem contribuir para o desequilíbrio de íons. Além disso, LT também tem efeitos sobre o sistema nervoso entérico, que controla a motilidade intestinal e a secreção de íons, e estimula a produção de citocinas pelas células intestinais (SALYERS e WHITT, 2002; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

2.3.1.2 Toxinas termo-estáveis (ST)

Ao contrário das LTs, as STs são toxinas pequenas, monoméricas que contêm resíduos de cisteína, cujas pontes dissulfeto são responsáveis pela estabilidade ao calor. Existem duas classes de ST, STa e STb, que diferem em estrutura e mecanismos de ação. Os genes de ambas as classes são encontrados predominantemente em plasmídeos, e alguns em transposons.

Praticamente só as toxinas da classe STa estão associadas com doença em humanos. Essa toxina contém 19 aminoácidos, seis dos quais são cisteínas que formam três pontes dissulfeto intramoleculares (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). STa se liga ao receptor guanilato ciclase C no epitélio intestinal, ativando-o, o que resulta em aumento dos níveis de guanina monofosfato cíclico (cGMP) intracelular. O aumento do cGMP faz com que haja aumento na secreção de íons cloreto e inibição da absorção de sódio, através do bloqueio de um transportador de Na/H^+ , causando secreção de fluido intestinal (VAANDRAGER, 2002).

STb causa danos teciduais no epitélio do intestino, como perda das vilosidades intestinais (NATARO e KAPER, 1998), estimula a secreção de bicarbonato pelas células do intestino, e não de cloreto como a STa (SEARS e KAPER, 1996), e aumenta os níveis de cálcio intracelular (DREYFUS *et al.*, 1993). Está associada com estirpes de ETEC isoladas de suínos, raramente é encontrada em isolados de humanos (LORTIE, DUBREUIL e HAREL, 1991). STa e STb têm efeitos sinérgicos no acúmulo de fluidos no intestino de modelos animais, sugerindo que elas têm diferentes mecanismos de ação (PETERSON e WHIPP, 1995).

2.3.1.3 Antígenos de fator de colonização (CFA)

Para causar diarreia, as estirpes de ETEC devem primeiro aderir aos enterócitos do intestino delgado, o que é mediado por uma ou mais adesinas, chamadas de CFA (antígenos de fator de colonização). Mais de 20 CFAs foram caracterizados e classificados de acordo com sua antigenicidade, peso molecular e morfologia estrutural. A maioria das ETEC isoladas de humanos expressam CFA/I, CFA/II ou CFA/IV (GAASTRA e SVENNERHOLM, 1996; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; TURNER *et al.*, 2006). Os genes das CFAs usualmente são codificados em plasmídeos, que também codificam as enterotoxinas ST e LT (NATARO e KAPER, 1998).

2.3.1.4 Outros fatores de virulência

TibA é uma proteína ancorada na parte exterior da membrana celular encontrada em algumas estirpes de ETEC. Esta proteína está associada à aderência não fimbrial das ETEC às células humanas (ELSINGHORST e WEITZ, 1994). Além da aderência às células dos humanos, TibA promove agregação bacteriana através de reconhecimento intercelular (TibA-TibA), com conseqüente formação de um biofilme, o que pode ter um importante papel na patogênese destas bactérias (SHERLOCK, VEJBORG e KLEMM, 2005).

Além da LT e ST, as toxinas EAST1, EatA e ClyA também podem ser produzidas pelas ETEC (TURNER *et al.*, 2006). O papel da EAST1 ainda é controverso. Entretanto, ensaios *in vivo* demonstraram que essa toxina pode induzir acúmulo de fluidos no intestino de ratos (SAVARINO *et al.*, 1991). EAST1 apresenta diversas similaridades com a Sta, como a presença de pontes dissulfeto, que conferem estabilidade ao calor e que são necessárias para sua função, identidade de 50% nas regiões funcionais, ativação da produção de cGMP e utilização do receptor de guanilato ciclase C (GC-C) como receptor nas células eucarióticas (TURNER *et al.*, 2006).

EatA é uma proteína autotransportadora. Possui homologia com um grupo amplo de autotransportadores chamados de serina protease autotransportadores de

Enterobacteriaceae (SPATES), que atuam como toxinas e proteases extracelulares (HENDERSON *et al.*, 2004). ClyA, também chamada de HlyE, é uma citotoxina formadora de poro. Foi identificada primeiramente na estirpe de *E. coli* K12 (LUDWIG *et al.*, 1999), e posteriormente em vários isolados clínicos, incluindo as ETEC.

2.3.2 Detecção

O diagnóstico das infecções causadas por ETEC é feito através do isolamento dos organismos em cultura e de testes que detectam a produção de toxinas. Um destes testes é a cultura de células de ovário de hamster Chinês (CHO), nas quais a toxina causa alterações na morfologia celular visualizadas pelo alongamento destas células. Entretanto, este tipo de ensaio não é realizado na rotina dos laboratórios clínicos. As ETEC ainda podem ser detectadas por métodos imunológicos como ELISA (GRAY, 1995), e ensaios moleculares que detectam genes que codificam LT e ST (LOPEZ-SAUCEDO *et al.*, 2003).

2.4 *E. coli* Enteroinvasora (EIEC)

EIEC foi descrita em 1944, quando foi denominada “paracolón bacillus”, mas foi posteriormente identificada como *E. coli* O124. Na década de 50, foi observado que um grupo de *E. coli* era capaz de causar ceratoconjuntivite em cobaias pelo teste de Sereny, uma característica encontrada em *Shigella*. Essas estirpes foram inicialmente classificadas como *Shigella* e mais tarde identificadas como *E. coli* subgrupo EIEC sorogrupo O164 (Monolov, D.G., 1959, citado em LAN *et al.*, 2004). Atualmente, devido aos resultados de estudos moleculares, se aceita que as estirpes de *Shigella* não são espécies separadas, mas constituem grupos distintos de linhagens patogênicas de *E. coli* (JOHNSON, 1999).

As EIEC têm relação bioquímica, genética e patogênica com *Shigella* spp (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Pois apresentam notável similaridade fenotípica,

com uma redução no número de substratos utilizados em relação às estirpes comensais de *E. coli*.

A maioria dos pacientes infectados por EIEC apresenta diarreia aquosa, indistinguível daquela causada por outras *E. coli* patogênicas. Somente uma minoria desenvolve disenteria, que se manifesta com sangue, muco e leucócitos nas fezes, cólicas abdominais severas e febre. A maioria dos estudos epidemiológicos relata a presença de EIEC em surtos. Nos casos esporádicos, muitas estirpes de EIEC provavelmente são identificadas erroneamente como *Shigella* spp. ou como estirpes de *E. coli* não patogênicas. Os surtos causados por EIEC são usualmente transmitidos por água e alimentos (NATARO e KAPER, 1998).

2.4.1 Principais fatores de virulência

2.4.1.1 Antígeno plasmidial de invasão (ipa) e locus associado à invasão (ial)

A invasão é o principal mecanismo de virulência da EIEC, compreende a penetração em células epiteliais, seguida pela lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento direcional no citoplasma e invasão das células adjacentes (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Esta característica depende da expressão de vários genes que são ativados em resposta a sinais do microambiente, e são codificados em um plasmídeo de invasão denominado pl_{Inv}, presente em *Shigella* e EIEC (HARRIS *et al.*, 1982).

Muito da patogênese de EIEC/*Shigella*, que compartilham as mesmas características de virulência, parece resultar dos múltiplos efeitos do sistema de secreção tipo III (SSTT) presente no plasmídeo de virulência. O SSTT secreta múltiplas proteínas codificadas nos *loci ipa* (*invasion associated plasmid*) que mediam eventos de sinalização na célula epitelial, rearranjo do citoesqueleto, captação celular, lise do vacúolo endocítico, entre outras. Embora o SSTT seja essencial para o processo de invasão dessas bactérias fatores de virulência adicionais de origem plasmidial e cromossomal foram descritos (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

O gene *ial* (*invasion associated locus*) e o gene *ipaH*, associados com invasão, estão presentes no plasmídeo de virulência e são utilizados para o diagnóstico de EIEC. Entretanto *ipaH* está presente também no cromossomo de EIEC e *Shigella* (LUSCHER e ALTWEGG, 1994), o que o torna um marcador estável para detectar a presença dessas bactérias.

2.4.2 Detecção

Diferenciar EIEC de *Shigella* spp e de outras estirpes de *E. coli*, incluindo as não patogênicas é difícil. Como *Shigella* spp, a maioria das estirpes de EIEC é imóvel, exceto o sorotipo O124:H30 (GIBOTTI *et al.*, 2004), não fermenta lactose e é lisina descarboxilase negativa. As poucas propriedades bioquímicas que diferenciam essas bactérias incluem L-serina e D-xilose e/ou mucato e acetato. EIEC pode ser positiva para um ou mais desses testes, enquanto que *Shigella* geralmente é negativa (LAN *et al.*, 2004). Um número reduzido de antígenos O são encontrados em EIEC, incluindo: O28:NM, O29:NM, O112ac:NM, O121:NM, O124:NM, O124:H7, O124:H30, O135, O136:NM, O143:NM, O144:NM, O152:NM, O159, O164:NM e O167:NM e O173. Três desses, O112ac, O124 e O152, são idênticos aos antígenos O presentes em *Shigella* (NATARO e KAPER, 1998; LAN *et al.*, 2004; NATARO *et al.*, 2007). A identificação também pode ser realizada utilizando cultivo celular e verificando o padrão de invasão em células HEp-2 ou HeLa, e ainda através da detecção de genes associados com invasão tais como *ipaH* e *ial* (LUSCHER e ALTWEGG, 1994; GRAY, 1995).

2.5 *E. coli* Enteroagregativa (EAEC)

Este grupo foi descrito em 1987, quando se observou que estirpes de *E. coli* aderiam à células HEp-2 gerando um fenótipo diferente do padrão localizado da EPEC. Este padrão diferenciado de adesão foi dividido em duas subcategorias: a aderência agregativa (AA), caracterizada pela autoaglutinação proeminente entre as bactérias na superfície celular; e a aderência difusa (DA), onde as bactérias ficam dispersas sobre a

superfície celular. As EAEC são definidas como estirpes de *E. coli* que não secretam toxina LT nem ST, e que aderem à células HEp-2 através do padrão autoagregativo, no qual as bactérias aderem uma à outra adquirindo uma configuração em tijolos empilhados (*stacked-brick*) (NATARO e KAPER, 1998). É provável que essa definição englobe tanto estirpes patogênicas quanto não-patogênicas (ELIAS *et al.*, 2002), entretanto pelo menos um subgrupo de EAEC é comprovadamente patogênico para humanos (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998).

A EAEC é cada vez mais reconhecida como causa de diarreia aguda, persistente em crianças e adultos, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (COHEN *et al.*, 1993; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Pacientes infectados com EAEC podem manifestar inflamação intestinal, notada pela presença de lactoferrina fecal e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-8 (GREENBERG *et al.*, 2002).

2.5.1 Principais fatores de virulência

A estratégia básica da patogênese da EAEC compreende a colonização da mucosa intestinal seguida pela secreção de enterotoxinas e citotoxinas, que resulta em diarreia secretória e lesão da mucosa (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998). Nenhum fator de virulência isoladamente foi associado com EAEC, os estudos indicam a participação de diversos fatores, de localização plasmideal e também cromossomal (ELIAS *et al.*, 2002; HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2006). A inflamação ocorre em resposta a uma proteína flagelar da EAEC, que induz a liberação de IL-8. A secreção desta citocina estimula a migração de neutrófilos através do epitélio e secreção de líquidos celulares (STEINER *et al.*, 2000). EAEC também provoca secreção de muco, que envolve a bactéria formando um biofilme. O papel da produção de muco pode estar relacionado com a diarreiogênese destas bactérias e, talvez, com sua habilidade de causar uma colonização persistente (NATARO e KAPER, 1998).

2.5.1.1 Plasmídeo de aderência agregativa (pAA)

O plasmídeo de aderência agregativa (pAA), também chamado de CVD432, tem sido utilizado em muitos estudos epidemiológicos como marcador para EAEC. Alguns genes codificados no pAA são as fimbrias de aderência agregativa (AAF-I e II) (CZECZULIN *et al.*, 1997), o ativador transcricional AggR (NATARO *et al.*, 1994), a toxina termo-estável de *E. coli* enteroagregativa 1 (EAST-1) (SAVARINO *et al.*, 1993), e a citotoxina Pet (HENDERSON, HICKS *et al.*, 1999). Entretanto a distribuição destes fatores de virulência é bastante heterogênea (NATARO e KAPER, 1998).

2.5.1.2 Fímbria de Aderência Agregativa (AAF)

As estirpes de EAEC aderem à células HEp-2 e à mucosa intestinal através das fimbrias de aderência agregativa (AAFs) (CZECZULIN *et al.*, 1997). Pelo menos quatro tipos de AAF existem, cada um presente numa minoria de estirpes (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

2.5.1.3 Outros fatores de virulência

A EAST1 (toxina termo-estável enteroagregativa 1) é uma enterotoxina de origem plasmídeal e apresenta homologia com o domínio enterotóxico da toxina termo-estável de ETEC (Stx) (SAVARINO *et al.*, 1993). Acredita-se que a EAST1 contribui para a diarreia aquosa, no entanto, o gene da EAST1 (*astA*) também pode ser encontrado em muitos isolados de *E. coli* comensais e, conseqüentemente, o papel dessa toxina na patogênese da diarreia permanece controverso (MENARD e DUBREUIL, 2002). Outras categorias de *E. coli*, como estirpes de STEC, produzem a EAST1 com uma freqüência maior que as estirpes de EAEC (SAVARINO *et al.*, 1996).

A toxina codificada por plasmídeo (Pet) induz efeitos citotóxicos causando contração do citoesqueleto e perda da tensão das fibras de actina (CANIZALEZ-ROMAN e NAVARRO-GARCIA, 2003). Embora a Pet desempenhe um papel na

patogênese da EAEC, ela está presente na minoria das estirpes (CZECZULIN *et al.*, 1999), o que indica heterogeneidade em termos de virulência nessas bactérias.

ShET1 e Pic são duas toxinas codificadas pelo mesmo locus cromossomal, mas em sentidos opostos. O gene maior codifica a protease com atividade de mucinase, chamada Pic. A outra extremidade codifica a enterotoxina oligomérica que é conhecida como enterotoxina *Shigella* 1 (ShET1), que parece estar relacionada com a diarreia secretória que acompanha a infecção por EAEC e por *Shigella* (HENDERSON, CZECZULIN *et al.*, 1999).

Outros genes de virulência (*aggR*, *astA*, *aafA*, *pet*, *aggA aap*, *irp2*, *pic*, *shf*, *aggC* e *aafC*) foram detectados em EAEC (MOON, PARK e KIM, 2005; UBER *et al.*, 2006), mas são distribuídos de forma heterogênea entre as estirpes, reforçando a diferença em termos de virulência entre essas bactérias.

2.5.2 Detecção

O diagnóstico de EAEC pode ser realizado pelo teste de aderência à células HEp-2 ou através da detecção de genes responsáveis pela aderência agregativa (NATARO e KAPER, 1998). A PCR para detectar o plasmídeo de virulência pAA também tem sido utilizado como método para o diagnóstico de EAEC (SCHMIDT *et al.*, 1995).

2.6 *E. coli* que Adere Difusamente (DAEC)

Essas *E. coli* são definidas pelo padrão difuso de aderência (DA) às células HEp-2 (NATARO e KAPER, 1998), no qual as bactérias distribuem-se uniformemente sobre toda a superfície celular (SCALETSKY, SILVA e TRABULSI, 1984). Diversos estudos implicaram DAEC como causa de diarreia, particularmente em crianças com mais de 12 meses de idade (SCALETSKY *et al.*, 2002; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

2.6.1 Principais fatores de virulência

Os processos patofisiológicos associados com as infecções causadas por DAEC ainda não são bem conhecidos. O padrão de aderência difusa é devido a adesinas codificadas por uma família de operons chamada de *afa/dra/daa* que levam à produção de adesinas fimbriais, F1845 e Dr, e não-fimbriais, AfaE-I e AfaE-III (LE BOUGUENEC e SERVIN, 2006).

As DAEC induzem um efeito citopático caracterizado por lesões nas microvilosidades e desenvolvimento de extensões celulares longas, as quais envolvem a bactéria aderente (BERNET-CAMARD *et al.*, 1996). Também são capazes de provocar reação inflamatória nas células intestinais através da indução de secreção de IL-8, citocina capaz de estimular a migração de leucócitos polimorfonucleares (BETIS *et al.*, 2003). No entanto, algumas estirpes de DAEC não induzem esta secreção em culturas de células de epitélio humano. Isto provavelmente deve-se ao fato de que o grupo de DAEC é composto por organismos heterogêneos que diferem entre si quanto a sua patogenicidade. Sendo assim, a adesão difusa é presumivelmente insuficiente para causar danos no intestino (ARIKAWA *et al.*, 2005).

2.6.1.1 Fímbria F1845

F1845 é uma fímbria presente na estirpe C1845 e é responsável pelo fenótipo DA das DAEC (BILGE *et al.*, 1989). O gene que codifica a F1845 é o *daaE* e está presente tanto no cromossomo da bactéria como em plasmídeo e apresenta homologia com os membros da família de adesinas Afa/Dr (NOWICKI *et al.*, 1990). As adesinas da família Dr reconhecem o antígeno Dr do sistema *Cromer blood-group*. Este antígeno corresponde ao domínio exposto do *decay-acceleration factor* (DAF – CD55) (TELEN *et al.*, 1988), sendo este utilizado pela F1845 como receptor. DAF é uma proteína ancorada na superfície celular responsável pela proteção das células de danos pelo sistema complemento (HASAN *et al.*, 2002), através da regulação da ativação do componente C3 nas células hematopoiéticas (TELEN *et al.*, 1988).

2.6.2 Detecção

DAEC podem ser identificadas através de ensaios de cultivo celular, onde se observa a presença de um padrão de aderência difusa, e PCR para genes de virulência (SCALETSKY, SILVA e TRABULSI, 1984).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo detectar a presença de estirpes de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) em culturas de amostras fecais de pessoas com diarreia e de pessoas saudáveis, através da amplificação de genes associados com virulência, e caracterizar os isolados.

3.2 Objetivos específicos

- Fazer a triagem de amostras fecais quanto à presença de *E. coli* diarreiogênicas utilizando genes de virulência que definem cada patotipo como marcadores.
- Isolar e caracterizar bioquimicamente as estirpes de *E. coli* diarreiogênicas.
- Determinar a incidência de DEC nos casos de diarreia e nos controles saudáveis.
- Determinar o padrão de susceptibilidade das DEC aos antimicrobianos.
- Realizar o ensaio de citotoxicidade em células Vero e determinar a presença ou não de genes de virulência acessórios *ehxA* (enterohemolisina), *saa* (adesina Saa) e *subA* (toxina subtilisina), para as estirpes de *E. coli* produtora de toxina Shiga.
- Confirmar a identidade dos produtos de amplificação através do seqüenciamento de DNA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

Foram analisadas 500 amostras de fezes, sendo 250 de indivíduos com diarreia e 250 de indivíduos saudáveis (grupo controle). As amostras diarréicas foram provenientes de crianças e adultos que realizaram coprocultura no Laboratório Frishmann Aisengart (213 amostras coletadas no período de agosto a outubro de 2007) ou no Laboratório Central do Paraná (37 amostras coletadas no período de março a agosto de 2007). A idade só foi verificada para as amostras positivas e depois de encerrado o período de análise. O grupo controle foi constituído por adultos assintomáticos e incluiu alunos da UFPR e funcionários de empresas que realizam exames periódicos semestrais dos empregados no Laboratório Frischmann Aisengart. As amostras fecais foram transportados em meio Cary Blair e mantidas sob refrigeração até o momento da cultura.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - UFPR sob o número de registro CEP/SD: 320SM102.06.12, CAEE: 0053.0.091.000-06 (ANEXO 1).

4.2 Bactérias utilizadas como controles

As características e a procedência das bactérias utilizadas como controles estão listadas na Tabela 1. Essas bactérias foram mantidas em TSB/glicerol 20% a -20°C.

4.3 Condições de cultivo

As amostras fecais foram inoculadas em ágar MacConkey e incubadas por 18 a 24 horas, a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, em aerobiose.

TABELA 1 – BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO CONTROLES

Bactéria	Genótipo	Procedência
EPEC E2348/69	<i>eae⁺, bfpA⁺</i>	UNIFESP ¹
STEC O157:H7	<i>stx₁⁺, stx₂⁺, eae⁺</i>	IAL ²
EIEC 307	<i>ial⁺, ipaH⁺</i>	IAL ²
ETEC H1040	<i>st⁺, lt⁺</i>	UNIFESP ¹
EAEC 2391	<i>CVD432⁺</i>	IAL ²
DAEC C1845	<i>daaE⁺</i>	UNIFESP ¹
<i>E. coli</i> ATCC 25922*	-	Oxoid
<i>E. coli</i> DH10B*	-	Invitrogen

¹ Universidade Federal de São Paulo - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

² Instituto Adolfo Lutz

*Não contém genes de virulência de DEC.

4.4 Triagem das culturas para a presença de DEC

Para realizar a triagem para DEC uma alça bacteriológica foi carregada com colônias que se desenvolveram no quadrante primário de cada cultura, e este material foi transferido para um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL contendo 500µL de água destilada estéril e utilizado para a extração de DNA (item 4.5).

4.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método da fervura (OLSVIK e STROCKBINE, 1993). As suspensões de bactérias (item 4.4.) foram fervidas por 10 minutos para liberação do DNA e então centrifugadas a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf modelo 5410) por 1 minuto. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e mantidos a -20°C até o momento da análise.

4.6 PCR

A detecção dos genes de virulência associados com os patótipos de *E. coli* diarreio gênicas foi realizada utilizando PCR-Multiplex. Os genes alvos selecionados

para a realização deste trabalho estão indicados na Tabela 2, juntamente com as seqüências dos respectivos oligonucleotídeos iniciadores.

TABELA 2 – INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS COM AS DEC

Categoria das DEC	Gene	Seqüência dos iniciadores (5´- 3´) e fonte	Tamanho do Fragmento (pb)
STEC	<i>stx1</i>	F CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G ²	150
		R AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC ¹	
	<i>stx2</i>	F GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC ¹	255
EPEC	<i>eae</i>	R TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G ¹	384
		F GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC ¹	
	<i>bfpA</i>	R CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG ¹	324
ETEC	<i>eae</i>	F AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC ²	384
		R GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA ²	
	<i>lt</i>	F GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC ¹	450
EIEC	<i>st</i>	R CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG ¹	190
		F GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC ²	
	<i>ial</i>	R´ CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT ²	650
EAEC	<i>ipaH</i>	F ATT TTT MTT TCT GTA TTR TCT T ⁶	600
		R CAC CCG GTA CAR GCA GGA TT ⁶	
	<i>CVD432</i>	F GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA ²	630
DAEC	<i>daaE</i>	R GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC ²	542
		F GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C ³	
	<i>16S</i>	R GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC ³	995
Controle		F CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT ³	
		R CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T ³	
		F GAA CGT TGG TTA ATG TGG GGT AA ⁴	
		R TAT TCA CCG GTC GGT TAT CAG T ⁴	
		F CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG ⁵	
		R ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC ⁵	

¹ PATON et al., J. Clin. Microbiol. 40: 271-274, 2002; ² LOPEZ-SAUCEDO et al., Emerg. Infect. Dis. 9:127-131, 2003;

³ ARANDA et al., J. Clin. Microbiol. 42: 5849-5853, 2004; ⁴ VIDAL et al., J. Clin. Microbiol. 43: 5362-5365, 2005;

⁵ LU et al., J. Clin. Microbiol. 38: 2076-2080 ; ⁶ STACY-PHIPPS et al., J. Clin Microbiol. 33: 1054-1059

Os oligonucleotídeos foram distribuídos em 2 sistemas (Tabelas 3 e 4), de acordo com o valor de ΔG calculado pelo programa OligoAnalyzer (IDT DNA – BioWeb; www.idtdna.com) para as possíveis interações entre os iniciadores. De acordo com informações obtidas naquele *site*, valores mais negativos que -9kcal poderiam causar problemas na reação de PCR devido a formação de heterodímeros. Para validar as reações de amplificação foram adicionados à PCR Multiplex iniciadores que reconhecem o gene do rRNA16S. Todos os iniciadores foram sintetizados pela Sinapse

(Campinas, SP). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biocycler MJ96G.

TABELA 3 – PROGRAMA UTILIZADO PARA PCR - SISTEMA 1

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	4 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	} 35
Anelamento	55°C	1 min	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão	72°C	5 min	1

TABELA 4 – PROGRAMA UTILIZADO PARA PCR - SISTEMA 2

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	4 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	} 35
Anelamento	58°C	1 min	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão	72°C	5 min	1

As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão da Taq (10X, Invitrogen), 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 1,0 µL de dNTP (5 mM), 0,15 µL de Taq Platinum (5U / µL, Invitrogen) e 3 µL de DNA (aproximadamente 20 ng). As concentrações iniciais de iniciadores utilizadas foram de 10pmol/µL para todos os iniciadores, no entanto, para se obter bandas de intensidade similares, as concentrações foram ajustadas. As seguintes concentrações foram utilizadas nas reações de PCR-Multiplex: 10 pmol/µL para os iniciadores *stx*₁; 12 pmol/µL para *stx*₂, *eae*, *lt*, *st*, *bfpA*, *CVD*, *daa*, *ipa* e *16S*, e 15 pmol/ µL para *ial*.

4.7 Detecção dos produtos de PCR

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,5% utilizando como tampão o Tris-Borato EDTA, pH 8.0, 1X concentrado. A separação eletroforética foi realizada a 40V durante 3 horas. Os géis foram corados durante 15 minutos em solução de brometo de etídio 0,5µg/mL

(SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989), visualizados em transiluminador ultravioleta e a imagem registrada com câmera digital.

4.8 Determinação da especificidade do método

Para determinar a especificidade do método utilizado foram utilizadas as seguintes bactérias: *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloaceae*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii* e *Serratia marcescens*, cultivadas como descrito no item 4.3, exceto *S. aureus* que foi cultivado em ágar sangue. A extração de DNA foi realizada como descrito no item 4.5.

4.9 Isolamento e identificação de colônias de DEC

Como na etapa de triagem foi utilizado DNA extraído de uma mistura de bactérias (itens 4.4 e 4.5), as amostras positivas foram novamente analisadas para identificar as colônias de DEC. Para cada amostra até 100 colônias isoladas, independentemente da reação de lactose, foram transferidas para uma placa de ágar MacConkey com áreas numeradas, e incubadas a 35 ± 1 °C por 18 a 24 horas. O DNA de cada colônia foi extraído como descrito no item 4.4, e utilizado em reação de PCR contendo apenas um par de iniciadores, de acordo com o resultado obtido na triagem. As colônias positivas para os genes de virulência foram estocadas em TSB/glicerol 20% a -20°C.

4.10 Caracterização bioquímica

As colônias isoladas, positivas para genes de virulência de DEC, foram caracterizadas bioquimicamente utilizando o sistema de identificação de enterobactérias API 20E (bioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante. O

4.11 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados foi determinado pelo método de difusão em ágar (CLSI, 2006).

4.12 Ensaio de citotoxicidade em células Vero

As estirpes de *E. coli* para as quais foi observada a amplificação dos genes *stx*₁ e/ou *stx*₂ foram avaliadas quanto à capacidade de produzir toxina Shiga através de ensaio de citotoxicidade em células Vero (GENTRY e DALRYMPLE, 1980). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular.

As bactérias foram inoculadas em frascos de 25 mL contendo 3mL de caldo Penassay (Antibiotic Medium nº 3, DIFCO) e incubadas a 37°C por 24 ou 48 horas. As culturas foram centrifugadas a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf modelo 5410) por 2 minutos, e os sobrenadantes foram filtrados em membranas com poros de 0,22 µm e mantidos a -20°C até a realização do ensaio.

As células Vero foram cultivadas em microplacas com 96 poços, contendo 200µL de meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 2mM de glutamina, 40µg/mL de garamicina, 10% de soro fetal bovino, 2,5µg/mL de anfotericina e 10µg/mL de ciprofloxacina. A microplaca foi incubada a 37°C durante 24 horas sob atmosfera de 5% de CO₂. Então um volume de 25µL de cada um dos filtrados foi inoculado nos poços das microplacas contendo 1×10^3 de células Vero, que foram então incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, por um período máximo de 72 horas. Foram realizadas leituras diárias para observar o efeito citotóxico e desprendimento celular, utilizando microscópio invertido (Nikon) com aumentos de 400 e 1000 vezes. As estirpes de STEC EDL 933 e *E. coli* DH10B foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

4.13 Determinação de genes de virulência acessórios de STEC

Para as estirpes de STEC a presença ou não dos genes *ehxA* (enterohemolisina), *saa* (adesina Saa) e *subA* (citotoxina subtilase) foi verificada de acordo com (PATON e PATON, 2002; 2005). A presença ou não dos genes *saa* e *ehxA* foi verificada num sistema de PCR-Multiplex juntamente com os genes *stx₁*, *stx₂*, *eae*; enquanto que para o gene *subA* foi realizada reação de PCR simples. As reações foram realizadas em termociclador Biocycler MJ96G.

4.14 Seqüenciamento de DNA

Os produtos de PCR (6 µl) foram tratados com as enzimas Exonuclease I (USB, 3,3 U) e SAP (Fosfatase alcalina de camarão - USB, 0,66 U) com o objetivo de eliminar os resíduos de iniciadores e de dNTP. Os tubos contendo a mistura foram incubados a 37°C durante 45 minutos, e então a 80°C por 15 minutos. O produto foi utilizado na reação de seqüenciamento, baseada no método de SANGER (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977) modificado utilizando dideoxinucleotídeos fluorescentes. As reações foram realizadas em volume final de 10µL contendo 10pmol de oligonucleotídeo iniciador, aproximadamente 200 ng do produto de PCR tratado e 4µL do reagente *DYEnamic ET Sequence Premix Terminator (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences)*. Foi utilizado o seguinte programa para os iniciadores do sistema 1 e 2: 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 60°C por 30s. O produto da reação de seqüenciamento foi transferido para tubo plástico de 500 µL ao qual foram adicionados 2µL de acetato de amônio 7,5M e 60 µL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex, mantida a temperatura ambiente por 20 minutos e então centrifugada por 25min a 14000rpm em microcentrífuga Eppendorf modelo 5410. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 250 µL de etanol 70% e seco em estufa a 37°C. O DNA foi dissolvido em 4 µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems) e submetido à eletroforese no Seqüenciador automático de DNA modelo ABI Prism 377 do Departamento de

Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. As seqüências obtidas foram analisadas com os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>).

4.15 Cálculo do índice de patogenicidade

O índice de patogenicidade (IP) foi calculado de acordo com Nataro e colaboradores (2006). O IP foi definido como a porcentagem de pessoas com diarreia que apresentaram um patógeno específico ou *E. coli* carreando um dos genes alvo de DEC, dividido pela respectiva porcentagem de controles com resultados positivos para aquele mesmo patógeno (NATARO *et al.*, 2006).

4.16 Análises estatísticas

O teste exato de Fisher realizado com o programa RxC (Miller, 1999), foi utilizado para comparar as variáveis não-contínuas. Foi considerado como significativo em todos os ensaios um valor de probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$).

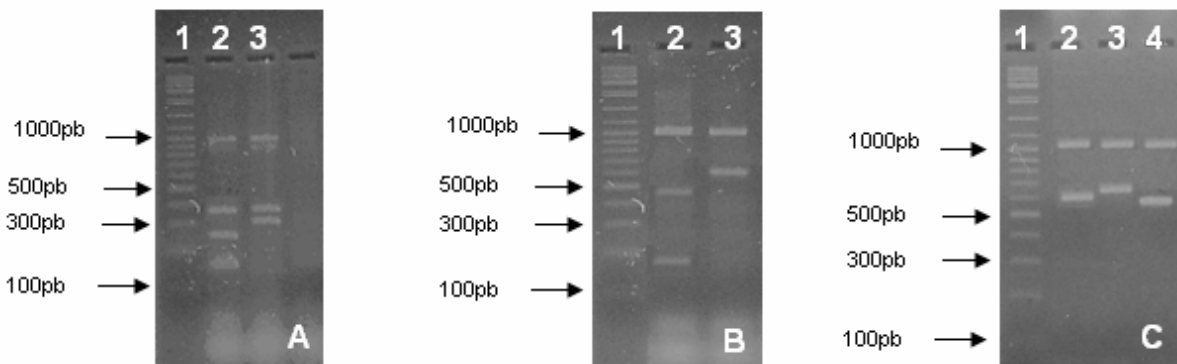
5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento das condições de reação para a PCR Multiplex

Foram definidos dois sistemas de PCR-Multiplex, de acordo com as análises realizadas utilizando o programa OligoAnalyzer (www.idtdna.com/instantkb). Iniciadores que formavam heterodímeros com valores de ΔG próximos de -9 kcal foram colocados em sistemas distintos. O sistema 1 continha os seguintes iniciadores: *stx*₁, *stx*₂, *eae* e *ial*; *st*, *lt*, *bfpA* e *16S*, e o sistema 2: *ipaH*, *CVD432*, *daaE* e *16S*.

A Figura 2 mostra os perfis obtidos para as bactérias utilizadas como controles positivos (Tabela 1) na PCR-Multiplex para detecção de genes de virulência de DEC.

FIGURA 2 - PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS DAS DEC



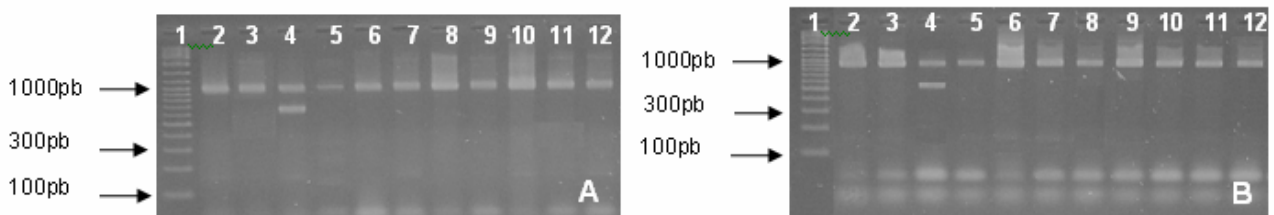
Eletroforese em gel de agarose a 2,5% dos controles positivos (A e B Sistema 1; C Sistema 2) **A)** 1. Marcador de massa molecular 100pb Fermentas; 2. STEC; 3. EPEC **B)** 1. Marcador de massa molecular 100pb Fermentas; 2. ETEC; 3. EIEC **C)** 1. Marcador de massa molecular 100pb Fermentas; 2. EIEC 3. EAEC; 4. DAEC

Observa-se que o padrão de bandas de amplificação obtido para cada patotipo está de acordo com o indicado na Tabela 2, o que mostra que o método empregado é capaz de detectar a presença de genes de virulência de DEC.

5.2 Determinação da especificidade do método

Para avaliar a especificidade do método as bactérias citadas no item 4.8. foram analisadas utilizando os mesmos sistemas de PCR-Multiplex. Os resultados estão mostrados na Figura 3.

FIGURA 3 - DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO MÉTODO



Eletroforese em gel de agarose a 2,5% (A Sistema 1; B Sistema 2) 1. Marcador de massa molecular 1kb Fermentas 2. *Escherichia coli* ATCC 25922 3. *Klebsiella pneumoniae* 4. *Shigella sonnei* 5. *Pseudomonas aeruginosa* 6. *Salmonella thyphimurium* 7. *Staphylococcus aureus* 8. *Enterobacter aerogenes* 9. *Enterobacter cloaceae* 10. *Providencia rettgeri* 11. *Citrobacter freundii* 12. *Serratia marcescens*

Observa-se, em todas as linhas, a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000 pb, correspondente ao gene rRNA 16S, o que confirma a presença de DNA na reação e a ausência de inibidores. Nas linhas 4A e 4B observa-se a presença de fragmentos de 600 e 650, indicando a presença dos genes *ipaH* e *ial*, respectivamente. Estes produtos de amplificação foram obtidos com o DNA de *Shigella sonnei*, que compartilha com EIEC os genes de virulência. Por essa razão será adotada nesse texto a nomenclatura EIEC/*Shigella* para amostras que apresentem esse perfil. Para as demais bactérias o ensaio foi negativo, indicando a especificidade do mesmo.

5.3 Triagem das culturas de fezes para a presença de DEC

5.3.1 Grupo controle

Amostras de fezes de duzentos e cinquenta indivíduos saudáveis foram analisadas por PCR-Multiplex (itens 4.3 a 4.7) na etapa de triagem. Em trinta e quatro

(13,6%) das amostras foram observadas bandas de DNA amplificado do tamanho esperado para DEC. Destas, 8 indicavam a presença de EPEC, 11 de STEC, 4 de ETEC, 13 de EAEC e 1 de DAEC. O ensaio foi repetido para confirmar o padrão de amplificação. As outras duzentas e dezesseis amostras foram consideradas negativas para DEC, uma vez que a presença de DNA bacteriano na mistura de reação foi confirmada pela amplificação do fragmento de 995 pb, correspondente ao gene rRNA16S de *Bacteria*, indicando a ausência de inibidores.

Nas oito amostras nas quais houve indicativo da presença de EPEC, foi observada apenas a banda correspondente a amplificação de um fragmento do gene *eae*. Não foi observada a amplificação da banda correspondente ao gene *bfpA*, indicando que todas são EPEC atípicas (aEPEC). Entre as 11 amostras com padrão de amplificação compatível com STEC, 1 foi positiva apenas para o gene *stx₁*, 1 para *stx₁* e *eae*, 1 para *stx₁*, *stx₂* e *eae*, 6 amostras somente para *stx₂* e 2 para *stx₂* e *eae*. Esse resultado sugere heterogeneidade em termos de virulência entre as STEC. Para ETEC foi observada a amplificação de *lt*, mas não do fragmento correspondente ao gene *st*. Essas culturas foram mantidas em geladeira para realizar posteriormente o isolamento das colônias de DEC.

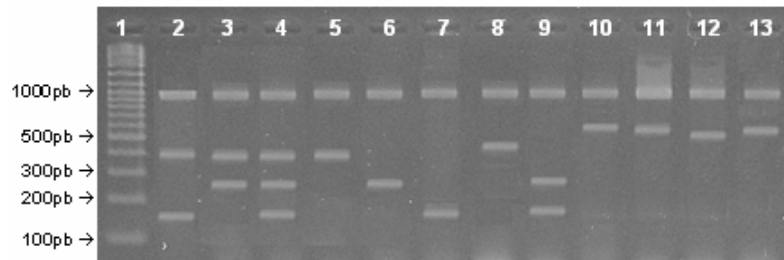
5.3.2 Indivíduos com diarreia

Entre as duzentas e cinquenta amostras diarréicas analisadas apenas trinta e três (13,2%) apresentaram produtos de amplificação de tamanho esperado para os genes de virulência de DEC. Foram encontrados os seguintes patótipos: EPEC (12), STEC (6), EIEC/*Shigella* (4), ETEC (2), EAEC (8) e DAEC (2).

Como observado no grupo controle, todas as EPEC pertencem ao grupo EPEC atípica, que não contém *bfpA*. Entre as amostras positivas para STEC 1 foi positiva apenas para *stx₁*, 1 para *stx₁* e *stx₂* e 4 apenas para *stx₂*. Nas duas amostras positivas para ETEC ocorreu amplificação compatível apenas com o gene *lt*. Resultado similar ao observado no grupo controle.

A Figura 4 mostra padrões representativos de DEC encontrados em amostras do grupo controle e nos doentes.

FIGURA 4 – PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO REPRESENTATIVO DAS ESTIRPES DE DEC ENCONTRADAS.

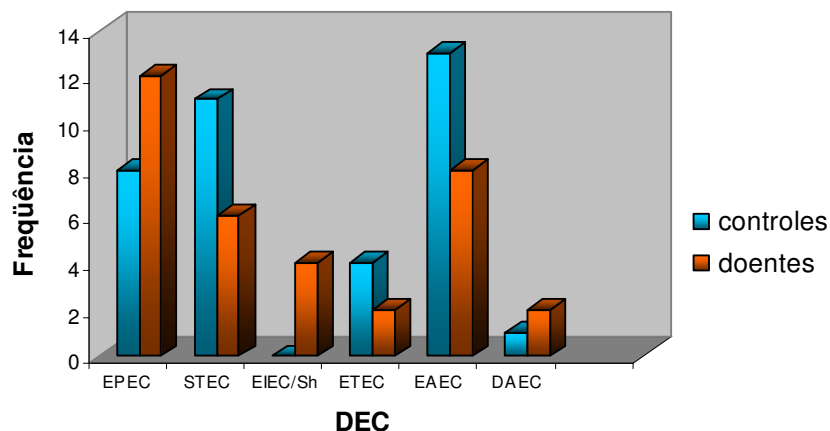


Eletroforese em gel de agarose a 2,5%. **1.** Marcador de massa molecular 1Kb Fermentas; de 2 a 13 padrão de amplificação de DEC, entre parênteses o patótipo. **2.** Amostra 107cs (STEC); **3.** Amostra 44cs (STEC); **4.** Amostra 62cs (STEC); **5.** Amostra 49d (EPEC); **6.** Amostra 150cs (STEC); **7.** Amostra 149d (STEC); **8.** Amostra 116d (ETEC); **9.** Amostra 10d (STEC); **10.** Amostra 29d (EIEC, sistema 1); **11.** Amostra 29d (EIEC, sistema 2); **12.** Amostra 133d (DAEC); **13.** Amostra 239d (EAEC).

Observa-se em todas as amostras a amplificação do fragmento referente ao gene 16S rRNA. Entre as STEC (linhas 2, 3, 4, 6, 7 e 9) observa-se variabilidade na distribuição dos genes *stx*₁, *stx*₂ e *eae*.

A frequência de DEC no grupo controle e nos doentes está representada no Gráfico 1.

GRÁFICO 1 – FREQUÊNCIA DE DEC NO GRUPO CONTROLE E NOS DOENTES



Com exceção de EIEC/*Shigella*, detectadas apenas entre os indivíduos que apresentavam diarreia, os outros patótipos de DEC foram encontrados em ambos os

grupos. EPEC e DAEC foram mais comuns entre os doentes, e STEC, ETEC e EAEC no grupo controle.

5.4. Isolamento e identificação das colônias de DEC

5.4.1 Grupo controle

As trinta e quatro culturas positivas para DEC na etapa de triagem foram novamente analisadas utilizando apenas o par de iniciadores específico para o patotipo em questão. Para cada uma delas, até 100 colônias, independentemente da reação de lactose, foram selecionadas e analisadas por PCR para que fosse possível a identificação das colônias que continham genes de virulência, e a conseqüente caracterização. Colônias de DEC foram identificadas em apenas 19 (55,9%) das 34 amostras. A Tabela 5 indica as amostras nas quais as colônias de DEC foram isoladas, o tamanho do fragmento do gene amplificado e patotipo correspondente.

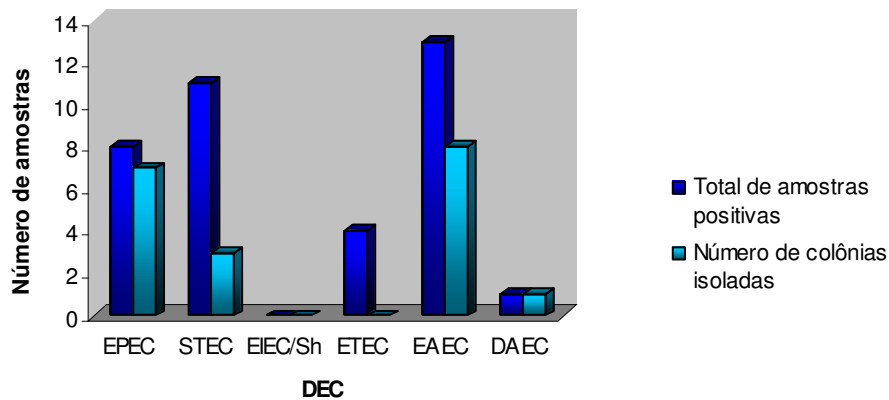
TABELA 5 –PATOTIPOS DE DEC ISOLADOS DE AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE

Amostra	Gene	Patotipo
3cs	<i>eae</i>	aEPEC
18cs	<i>CVD432</i>	EAEC
21cs	<i>CVD432</i>	EAEC
56cs	<i>CVD432</i>	EAEC
65cs	<i>eae</i>	aEPEC
66cs	<i>CVD432</i>	EAEC
77cs	<i>daaE</i>	DAEC
78cs	<i>eae</i>	aEPEC
88cs	<i>stx₂</i>	STEC
94cs	<i>eae</i> ,	aEPEC
107cs	<i>stx₁, eae</i>	STEC
128cs	<i>eae</i>	aEPEC
132cs	<i>eae</i>	aEPEC
150cs	<i>stx₂</i>	STEC
173cs	<i>CVD432</i>	EAEC
179cs	<i>CVD432</i>	EAEC
191cs	<i>CVD432</i>	EAEC
225cs	<i>eae</i>	aEPEC
226cs	<i>CVD432</i>	EAEC

Foram identificadas 3 estirpes de STEC, 7 de EPEC, 8 de EAEC e uma de DAEC. Uma estirpe de STEC apresentou o genótipo *stx₁ eae*, o mais freqüente nas estirpes isoladas de humanos no país (VAZ *et al.*, 2004), e duas apenas o gene *stx₂*. Nenhuma colônia de ETEC foi identificada.

O gráfico 2 mostra o número de amostras positivas na triagem e o número de amostras das quais foram isoladas e identificadas as colônias de DEC no grupo controle.

GRÁFICO 2 – NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS NA TRIAGEM E NÚMERO DE DEC RECUPERADAS DOS CONTROLES SAUDÁVEIS



Para EPEC em sete (87,5%) das oito amostras positivas foram identificadas as colônias responsáveis pelo padrão de amplificação compatível com aquele patotipo. Para EAEC, as colônias foram isoladas em 8 (61,5%) das 13 amostras positivas. Na única amostra positiva para DAEC foi possível isolar a colônia responsável por este perfil. Entretanto para STEC, das 11 amostras positivas na triagem, em apenas 3 (27,3%) as colônias foram detectadas; e nenhuma colônia com padrão compatível com ETEC foi recuperada.

5.4.2 Indivíduos com diarréia

No grupo dos indivíduos com diarréia colônias de DEC foram isoladas de apenas 21 (63,6%) das 33 amostras positivas na triagem. As amostras das quais as colônias

positivas foram isoladas estão indicadas no Gráfico 3 e na Tabela 6, que também informa a idade dos indivíduos.

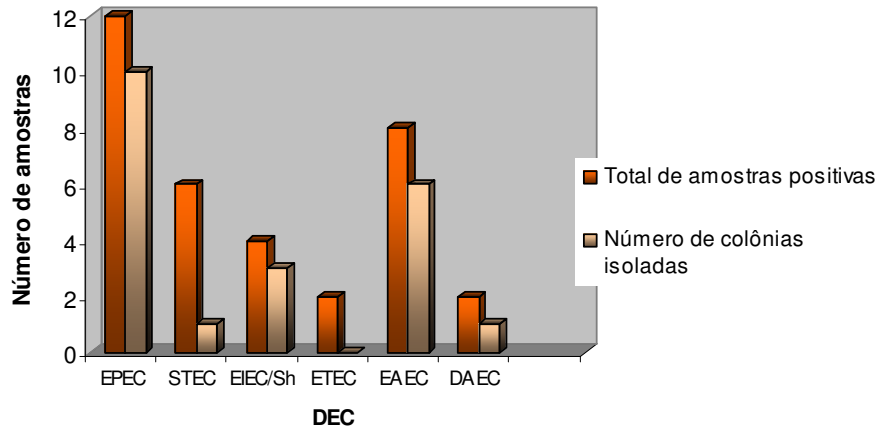
TABELA 6 – PATOTIPOS DE DEC ISOLADOS DE AMOSTRAS DIARREICAS E IDADE DOS INDIVÍDUOS COM DIARRÉIA

Amostra	Gene	Patotipo	Idade
10d	<i>stx₁, stx₂</i>	STEC	45
25d	<i>ipaH, ial</i>	EIEC/ <i>Shigella</i>	13
27d	<i>ipaH, ial</i>	EIEC/ <i>Shigella</i>	1
28d	<i>eae</i>	aEPEC	7 meses
29d	<i>ipaH, ial</i>	EIEC/ <i>Shigella</i>	-
49d	<i>eae</i>	aEPEC	50
75d	<i>CVD432</i>	EAEC	-
85d	<i>eae</i>	aEPEC	2
86d	<i>eae</i>	aEPEC	1
133d	<i>daaE</i>	DAEC	5
141d	<i>CVD432</i>	EAEC	1
171d	<i>CVD432</i>	EAEC	5
172d	<i>eae</i>	aEPEC	30
190d	<i>eae</i>	aEPEC	25
200d	<i>eae</i>	aEPEC	26
213d	<i>eae</i>	aEPEC	43
216d	<i>eae</i>	aEPEC	4
217d	<i>CVD432</i>	EAEC	35
237d	<i>eae</i>	aEPEC	9
239d	<i>CVD432</i>	EAEC	6 meses
245d	<i>CVD432</i>	EAEC	45

As seguintes DEC foram isoladas de adultos: STEC (1), aEPEC (5) e EAEC (2). Em crianças maiores de 2 anos foram encontradas: aEPEC (2), EIEC/*Shigella* (1), EAEC (1) e DAEC (1), enquanto que naquelas de até 2 anos de idade foram isoladas aEPEC (3), EAEC (2) e EIEC/*Shigella* (1).

O gráfico 3 compara o número de amostras positivas na triagem para DEC com o número de colônias recuperadas nos indivíduos doentes.

GRÁFICO 3 – NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS NA TRIAGEM E NÚMERO DE DEC RECUPERADAS DAS AMOSTRAS DIARRÉICAS



O número de amostras das quais colônias de DEC foram recuperadas foi de 10 (83,3%) para aquelas positivas para aEPEC, 1 para STEC (16,7%), 3 para EIEC/*Shigella* (75%), 6 para EAEC (75,0%) e 1 para DAEC (50%).

O baixo número de colônias de DEC recuperadas pode ser decorrente da elevada sensibilidade da técnica de PCR que é capaz de detectar a presença de patógenos em baixo número na amostra (PATON *et al.*, 1993). Dessa forma, nas amostras com número muito baixo de DEC, a detecção foi possível na etapa de triagem. Entretanto, como na etapa de isolamento no máximo 100 colônias individuais foram analisadas, seria esperado resultado positivo apenas nas amostras nas quais as DEC representassem mais de 1% dos coliformes da flora intestinal.

5.5 Caracterização bioquímica

Os resultados obtidos na identificação bioquímica dos isolados dos controles saudáveis e dos indivíduos doentes estão descritos nas Tabelas 7, 8 e 9.

TABELA 7 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS DEC ISOLADAS DO GRUPO CONTROLE

Prova	Amostras									
	3cs	18cs	21cs	56cs	65cs	66cs	77cs	78cs	88cs	94cs
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LDC	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ODC	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RHA	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
SAC	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
MEL	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Identificação	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>

ONPG – orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidase; ADH – arginina dihidrolase; LDC – lisina descarboxilase; ODC – ornitina descarboxilase; CIT – utilização do citrato; H₂S – produção de H₂S; URE – urease; TDA – triptofano desaminase; IND – produção de indol; VP – produção de acetoína (Voges Proskauer); GEL – gelatinase; GLU – glucose; MAN – manitol; INO – inositol; SOR – sorbitol; RHA – ramnose; SAC – sacarose; MEL – melibiose; AMY – amigdalina; ARA – arabinose; OX – citocromo oxidase; LAC – lactose.

TABELA 7 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS DEC ISOLADAS DO GRUPO CONTROLE

Prova	Amostras								
	107cs	128cs	132cs	150cs	173cs	179cs	191cs	225cs	226cs
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ODC	+	+	-	-	-	-	-	+	+
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	-	+	-	+	+
SAC	+	+	-	-	-	-	-	+	+
MEL	+	+	+	+	+	+	+	+	-
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OX	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Identificação	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>

ONPG – orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidase; ADH – arginina dihidrolase; LDC – lisina descarboxilase; ODC – ornitina descarboxilase; CIT – utilização do citrato; H₂S – produção de H₂S; URE – urease; TDA – triptofano desaminase; IND – produção de indol; VP – produção de acetoina (Voges Proskauer); GEL – gelatinase; GLU – glucose; MAN – manitol; INO – inositol; SOR – sorbitol; RHA – ramnose; SAC – sacarose; MEL – melibiose; AMY – amigdalina; ARA – arabinose; OX – citocromo oxidase; LAC- lactose.

TABELA 8 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS DEC ISOLADAS DOS INDIVÍDUOS COM DIARRÉIA

Prova	Amostras										
	10d	25d	27d	28d	29d	49d	75d	85d	86d	133d	141d
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
RHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SAC	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
MEL	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Identificação	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>

ONPG – orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidase; ADH – arginina dihidrolase; LDC – lisina descarboxilase; ODC – ornitina descarboxilase; CIT – utilização do citrato; H₂S – produção de H₂S; URE – urease; TDA – triptofano desaminase; IND – produção de indol; VP – produção de acetoína (Voges Proskauer); GEL – gelatinase; GLU – glucose; MAN – manitol; INO – inositol; SOR – sorbitol; RHA – ramnose; SAC – sacarose; MEL – melibiose; AMY – amígdalina; ARA – arabinose; OX – citocromo oxidase; LAC – lactose.

TABELA 8 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS DEC ISOLADAS DOS INDIVÍDUOS COM DIARRÉIA

Prova	Amostras									
	171d	172d	190d	200d	213d	216d	217d	237d	239d	245d
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DC	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
SAC	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
MEL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Identificação	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>

ONPG – orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidase; ADH – arginina dihidrolase; LDC – lisina descarboxilase; ODC – ornitina descarboxilase; CIT – utilização do citrato; H₂S – produção de H₂S; URE – urease; TDA – triptofano desaminase; IND – produção de indol; VP – produção de acetoina (Voges Proskauer); GEL – gelatinase; GLU – glucose; MAN – manitol; INO – inositol; SOR – sorbitol; RHA – ramnose; SAC – sacarose; MEL – melibiose; AMY – amigdalina; ARA – arabinose; OX – citocromo oxidase; LAC – lactose.

Após a identificação bioquímica das bactérias isoladas verificou-se que a frequência de DEC foi de 7,6% (19/250) para os controles saudáveis e para os indivíduos com diarreia. No último grupo foram encontradas 2 estirpes de *Shigella sonnei* até então computadas como EIEC/*Shigella*. No grupo controle a frequência foi de 3,2% para EAEC, 2,8% para aEPEC, 1,2% de STEC e 0,4% para DAEC. Entre os indivíduos com diarreia a frequência foi de 4,0% para aEPEC, 2,4% para EAEC, 0,8% para *Shigella sonnei*, 0,4% para EIEC, STEC e DAEC.

A tabela 9 mostra o comportamento bioquímico das estirpes isoladas de acordo com o patotipo.

TABELA 9 – PERFIL BIOQUÍMICO DAS ESTIRPES DE DEC*

Prova	aEPEC	STEC	DEC		
			EIEC	EAEC	DAEC
ONPG	100	100	100	100	100
ADH	5,9	0	0	0	0
LDC	100	100	0	84,6	100
ODC	58,8	80	100	30,8	100
CIT	0	0	0	0	0
H ₂ S	0	0	0	0	0
URE	0	0	0	0	0
TDA	0	0	0	0	0
IND	100	100	100	100	100
VP	0	0	0	0	0
GEL	0	0	0	0	0
GLU	100	100	100	100	100
MAN	100	100	100	100	100
INO	0	0	0	0	0
SOR	94,1	100	0	100	100
RHA	100	100	100	53,8	100
SAC	52,9	60	100	30,8	100
MEL	94,1	100	100	84,6	100
AMY	0	0	0	0	0
ARA	100	100	100	100	100
OX	0	0	0	0	0
LAC	100	100	100	92,3	100

* Os números indicam a porcentagem de reações positivas.

Treze biotipos distintos foram observados para as DEC: 5144552 (2 DEC, sendo 1 STEC e 1 EPEC), 5044552 (7 DEC, sendo 4 EPEC, 1 EAEC e 1 STEC), 1144172 (1 EIEC), 5044152 (1 EPEC), 5044542 (5 EAEC), 5044511 (1 EAEC), 5144512 (1 EAEC), 5044572 (2 EPEC), 1144572 (1 EAEC), 7144572 (1 EPEC), 1044542 (1 EAEC), 5144532 (1 EAEC) e 5144572 (14 DEC), sendo 8 EPEC, 2 STEC, 2 EAEC e 2 DAEC). Para *Shigella sonnei* foi observado o biotipo 1104112.

5.6 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os padrões de suscetibilidade aos antimicrobianos estão descritos nas Tabelas 10, 11 e 12.

TABELA 10 – PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO GRUPO CONTROLE

Amostra	Antimicrobiano														
	AMC	AMP	ATM	KF	FEP	CTX	FOX	CAZ	CRO	CIP	CN	IPM	TZP	STX	TE
3cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18cs	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
21cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
56cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
65cs	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R
66cs	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
77cs	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
78cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
88cs	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
94cs	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
107cs	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
128cs	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
132cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
150cs	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
173cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
179cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
191cs	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
225cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
226cs	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S

AMC - amoxicilina/ác.clavulânico; AMP - ampicilina ; ATM - aztreonam ; KF - cefalotina; FEP - cefepime; CTX - cefotaxime; FOX - cefoxitina; CAZ – ceftazidime; CRO – ceftriaxona; CIP – ciprofloxacina; CN – gentamicina; IPM- imipenem; TZP – piperacilina/tazobactam; STX – sulfametaxazol/trimetopim; TE – tetraciclina.
R – resistente; I – intermediário; S – sensível.

TABELA 11 – PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DOS DOENTES

Amostra	Antibiótico														
	AMC	AMP	ATM	KF	FEP	CTX	FOX	CAZ	CRO	CIP	CN	IPM	TZP	STX	TE
10d	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25d	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27d	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28d	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29d	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
49d	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
75d	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
85d	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
86d	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
133d	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
141d	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
171d	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
172d	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
190d	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
200d	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
213d	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R
216d	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
217d	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
237d	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
239d	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
245d	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

AMC - amoxicilina/ác.clavulânico; AMP - ampicilina ; ATM - aztreonam ; KF - cefalotina; FEP - cefepime; CTX - cefotaxime;FOX - ceftaxina; CAZ – ceftazidime; CRO – ceftriaxona; CIP – ciprofloxacina; CN – gentamicina; IPM- imipenem; TZP – piperacilina/tazobatam; STX – sulfametaxazol/trimetopim; TE – tetraciclina.
R – resistente; I – intermediário; S – sensível.

Entre as 40 bactérias analisadas frente aos antimicrobianos, apenas 13 (32,5%) foram suscetíveis a todas as drogas e incluíam EPEC (7), EAEC (4), STEC (1) e EIEC (1) (Tabela 12).

TABELA 12 – PADRÕES DE RESISTÊNCIA OU DE RESPOSTA INTERMEDIÁRIA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS AOS ANTIMICROBIANOS

ANTIMICROBIANO(S)	DEC/(Número de estirpes)
Ampicilina ^R	EAEC (1)
Tetraciclina ^R	EPEC (2)
Tetraciclina ^R , Sulfametoxazol/Trimetoprim ^R	EPEC (1), EAEC (1)
Tetraciclina ^R , Cefalotina ^R	STEC (1)
Ampicilina ^R , Tetraciclina ^R ,	EAEC (1)
Ampicilina ^R , Cefalotina ^R , Gentamicina ^R	EAEC(1)
Ampicilina ^R , Cefalotina ^R , Sulfamexazol/Trimetoprim ^R	EPEC (1)
Ampicilina ^R , Cefalotina ^R , Sulfamexazol/Trimetoprim ^R , Tetraciclina ^R	EAEC (1)
Ampicilina ^R , Aztreonam ^R , Cefalotina ^R , Cefotaxime ^R , Ceftriaxona ^R , Tetraciclina ^R .	EPEC (1)
Cefalotina ^I	EPEC(2), STEC(3)
Ampicilina ^I , Cefalotina ^I	EPEC (1)
Ampicilina ^R , Cefalotina ^I	EPEC (1), EAEC (2), <i>Shigella</i> (2)
Cefalotina ^I , Tetraciclina ^R	EPEC (1)
Ampicilina ^R , Cefalotina ^I , Gentamicina ^R	EAEC (1)
Ampicilina ^R , Cefalotina ^I , Tetraciclina ^R	EAEC (1)
Ampicilina ^R , Cefalotina ^I , Sulfamexazol/Trimetoprim ^R	EAEC (1)
Ampicilina ^R , Cefalotina ^I , Sulfamexazol/Trimetoprim ^I , Tetraciclina ^R	EPEC (1)

I - intermediário; R - resistente

Foi verificada resistência a oito dos 15 antimicrobianos testados. A resistência mais freqüentemente observada foi à ampicilina (14 estirpes), seguida de tetraciclina (11 estirpes), cefalotina e sulfametoxazol-trimetoprim (5 estirpes cada). Apenas 2 estirpes foram resistentes à gentamicina, e uma para aztreonam, cefotaxime e ceftriaxona. Estirpes multirresistentes foram encontradas entre as EPEC (3), EAEC (2) e DAEC (1).

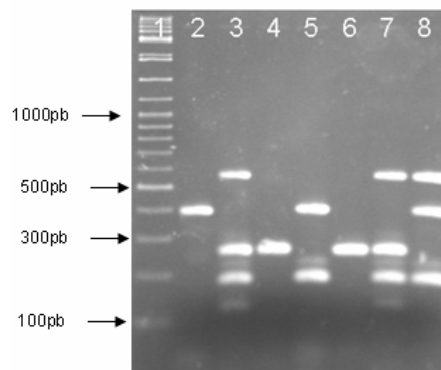
5.7 Ensaio de citotoxicidade em células Vero

As colônias de STEC isoladas (amostras 88cs, 107cs, 150cs e 10d) foram analisadas quanto à produção de toxina Shiga através do ensaio de citotoxicidade em células Vero, como descrito no item 4.13. A expressão da toxina Shiga foi observada nas estirpes isoladas das amostras 88cs, 107cs e 10d, mas não da amostra 150cs.

5.8 Genes de virulência acessórios de STEC

A Figura 5 mostra os resultados da PCR-Multiplex para genes de virulência (*stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA* e *saa*) de STEC.

FIGURA 5 – PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA ACESSÓRIOS DE STEC



Eletroforese em gel de agarose a 2,5%. **1.** Marcador de massa molecular Fermentas; **2.** Amostra 3cs (controle positivo para *eae*); **3.** 10d (*stx*₁ *stx*₂ *ehxA*); **4.** Amostra 88cs (*stx*₂); **5.** Amostra 107cs (*stx*₁ *eae*); **6.** Amostra 150cs (*stx*₂); **7.** Amostra 10d (*stx*₁ *stx*₂ *ehxA*); **8.** Controle STEC M03 (*stx*₁ *eae* *ehxA*)

Os seguintes genótipos foram observados: *stx*₁*stx*₂ *ehxA* (STEC 10d, linhas 3 e 7), *stx*₂ (STEC 88cs e 150cs, linhas 4 e 6, respectivamente) e *stx*₁ *eae* (STEC 107cs, linha 5). O ensaio para detecção do gene da toxina subtilisina foi negativo para todas as STEC (não mostrado).

TABELA 13 – FREQUÊNCIA DOS PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS EM INDIVÍDUOS COM E SEM DIARRÉIA E ÍNDICE DE PATOGENICIDADE

Patotipo	Grupo Controle (%)	Grupo Doentes (%)	p*	Índice de Patogenicidade (% doentes / %controle)
aEPEC	7 (2,8)	10 (4)	0,35	1,43
STEC	3 (1,2)	1 (0,4)	0,33	0,33
EIEC	0	1 (0,4)	0,48	-
EAEC	8 (3,2)	6 (2,4)	0,51	0,75
DAEC	1 (0,4)	1 (0,4)	1,00	1

*p – teste exato de Fisher, comparação controle x doentes.

Os resultados da Tabela 13 indicam que nenhuma das DEC está associada significativamente com diarreia.

5.9 Seqüenciamento dos amplicons

Os resultados do seqüenciamento dos amplicons, após a comparação com as seqüências depositadas no GenBank e alinhamento utilizando o programa Clustal W, estão mostrados na Tabelas 14 a 19 e nas Figuras 6 a 18. Identidades menores que 100% provavelmente resultam do fato de que cada seqüência foi realizada apenas uma vez.

TABELA 14 – SEQÜÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE *eae* (aEPEC)

Amostra	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
3cs	<i>E. coli</i> - genes de intimina alfa, iota, zeta, kappa e jota	565	3e-158	100%
65cs	<i>E. coli</i> - genes de intimina alfa, iota, zeta, kappa e jota	565	3e-158	100%
78cs	<i>E. coli</i> - genes de intimina alfa, iota, zeta, kapa e jota	553	2e-154	99%
94cs	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina beta 2	565	3e-158	100%
128cs	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina beta, intimina sigma	560	1e-156	99%
132cs	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina teta, intimina gama	560	1e-156	99%
225cs	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina beta 2	565	3e-158	100%
28d	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina epsilon	536	1e-149	97%
49d	<i>E. coli</i> - genes de intimina alfa, iota, zeta, kappa e jota	565	3e-158	100%
85d	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina teta, intimina gama	560	1e-156	99%
86d	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina gama	565	3e-158	100%
172d	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina beta, intimina sigma	560	1e-156	99%
190d	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina teta, intimina gama	560	1e-156	99%
200d	<i>E. coli</i> - genes de intimina mu, intimina eta 2	565	3e-158	99%
213d	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina teta, intimina gama	558	5e-156	99%
216d	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina beta 2	565	3e-158	100%
237d	<i>E. coli</i> - genes de intimina, intimina teta, intimina gama	515	5e-143	96%

FIGURA 6 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE aEPEC 3CS, 49D, 65CS E 78CS COM O GENE DA INTIMINA IOTA DE *E. coli* ESTIRPE 1252-59

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
aEPEC_3CSc  TTTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_65CS  TTTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_49 D  TTTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
Ec_1252-59  TTTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_78CS  TTTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
Clustal Co  *****
          60          70          80          90          100
aEPEC_3CSc  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
aEPEC_65CS  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
aEPEC_49 D  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
Ec_1252-59  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
aEPEC_78CS  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
Clustal Co  *****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110          120          130          140          150
aEPEC_3CSc TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
aEPEC_65CS TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
aEPEC_49 D TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
Ec_1252-59 TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
aEPEC_78CS TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
Clustal Co *****

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160          170          180          190          200
aEPEC_3CSc CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
aEPEC_65CS CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
aEPEC_49 D CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
Ec_1252-59 CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
aEPEC_78CS CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
Clustal Co *****

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210          220          230          240          250
aEPEC_3CSc TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_65CS TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_49 D TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
Ec_1252-59 TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_78CS TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAA ATCATTTTGC
Clustal Co *****

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260          270          280          290          300
aEPEC_3CSc CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
aEPEC_65CS CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
aEPEC_49 D CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
Ec_1252-59 CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
aEPEC_78CS CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GACTACAGTG CCTTNCCACT TTTAGGTTTCG
Clustal Co *****

.....|.....| ...
          310
aEPEC_3CSc GCACCTCTTG TTG
aEPEC_65CS GCACCTCTTG TTG
aEPEC_49 D GCACCTCTTG TTG
Ec_1252-59 GCACCTCTTG TTG
aEPEC_78CS GCACCTCTTG TTG
Clustal Co *****

```

NOTA : Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

FIGURA 7 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DO AMPLICON DE aEPEC 200D COM O GENE DA INTIMINA MU DE *E. coli* ESTIRPE MA 551/1

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              10          20          30          40          50
Ec_MA551/1  TTTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_200d TTTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
Clustal Co  *****

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              60          70          80          90         100
Ec_MA551/1  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
aEPEC_200d ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA ANGTAGCTAT CAGAATCGCC
Clustal Co  *****

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              110         120         130         140         150
Ec_MA551/1  TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
aEPEC_200d TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
Clustal Co  *****

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              160         170         180         190         200
Ec_MA551/1  CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
aEPEC_200d CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
Clustal Co  *****

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              210         220         230         240         250
Ec_MA551/1  TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC AGGTCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_200d TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC AGGTCAGCAG ATCATTTTGC
Clustal Co  *****

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              260         270         280         290         300
Ec_MA551/1  CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
aEPEC_200d CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
Clustal Co  *****

```

```

      ....|.....| ...
              310
Ec_MA551/1  GCACCTCTTG TTG
aEPEC_200d GCACCTCTTG TTG
Clustal Co  *****

```

NOTA: Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

FIGURA 8 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE aEPEC 94CS, 216D E 225CS COM O GENE DA INTIMINA DE *E. coli* ESTIRPE DG 161/4

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
aEPEC_94 D   TTTTTTTATG TTAATCAGAA CTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_216D  TTTTTTTATG TTAATCAGAA CTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_225c  TTTTTTTATG TTAATCAGAA CTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
Ec_DG161/4  TTTTTTTATG TTAATCAGAA CTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
Clustal Co  *****
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90         100
aEPEC_94 D   ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
aEPEC_216D  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
aEPEC_225c  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
Ec_DG161/4  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TAATAGCTAT CAGAATCGCC
Clustal Co  *****
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
aEPEC_94 D   TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
aEPEC_216D  TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
aEPEC_225c  TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
Ec_DG161/4  TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTGCCGATCT TTCTAAATCG
Clustal Co  *****
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
aEPEC_94 D   CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
aEPEC_216D  CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
aEPEC_225c  CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
Ec_DG161/4  CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
Clustal Co  *****
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
aEPEC_94 D   TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_216D  TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_225c  TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
Ec_DG161/4  TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
Clustal Co  *****
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
aEPEC_94 D   CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
aEPEC_216D  CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
aEPEC_225c  CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
Ec_DG161/4  CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CCTTACCACT TTTAGGTTTCG
Clustal Co  *****
.....|.....| ...
          310
aEPEC_94 D   GCACCTCTTG TTG
aEPEC_216D  GCACCTCTTG TTG
aEPEC_225c  GCACCTCTTG TTG
Ec_DG161/4  GCACCTCTTG TTG
Clustal Co  *****

```

NOTA: Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

FIGURA 9 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE aEPEC 128CS E 172D COM O GENE DA INTIMINA BETA DE *E. coli* ESTIRPE CK 379

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                10         20         30         40         50
Ec_CK 379      TTTTTTTATG TTAACCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_128c    TTTTTTTATG TTAACCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_172d    TTTTTTTATG TTAACCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
Clustal Co    *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                60         70         80         90        100
Ec_CK 379      ATTGAGTTCA GATTCAAAAC TGTTAACTCA AAATGCCGCT CAGGATCGCC
aEPEC_128c    ATTGAGTTCA GATTCAAAAC TGTTAACTCA AAATGCCGCT CAGGATCGCC
aEPEC_172d    ATTGAGTTCA GATTCAAAAC TGTTAACTCA AAATGCCGCT CAGGATCGCC
Clustal Co    *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                110        120        130        140        150
Ec_CK 379      TTTTTTATAC GTTAAAAACA GGTGAAACTG TTGCCAATAT TTCTAAATCA
aEPEC_128c    TTTTTTATAC GTTAAAAACA GGTGAAACTG TTGCCAATAT TTCTAAATCA
aEPEC_172d    TTTTTTATAC GTTAAAAACA GGTGAAACTG TTGCCAATAT TTCTAAATCA
Clustal Co    *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                160        170        180        190        200
Ec_CK 379      CAGGGTATCA GTTTATCGGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
aEPEC_128c    CAGGGTATCA GTTTATCGGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
aEPEC_172d    CAGGGTATCA GTTTATCGGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
Clustal Co    *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                210        220        230        240        250
Ec_CK 379      TTCCGAAAGC GAAATGATGA AGGCTGGACC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_128c    TTCCGAAAGC GAAATGATGA AGGCTGGACC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_172d    TTCCGAAAGC GAAATGATGA AGGCTGGACC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
Clustal Co    *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                260        270        280        290        300
Ec_CK 379      CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATAGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
aEPEC_128c    CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATAGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
aEPEC_172d    CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATAGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
Clustal Co    *****

```

```

      ....|....| ...
                310
Ec_CK 379      GCACCTGTTG TTG
aEPEC_128c    GCACCTCTTG TTG
aEPEC_172d    GCACCTCTTG TTG
Clustal Co    *****

```

NOTA: Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

FIGURA 10 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE aEPEC 85D, 132CS, 190D, 213D E 237D COM O GENE DA INTIMINA THETA DE *E. coli* ESTIRPE DEC 8b

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
aEPEC_190d TTTTTTTATG TTAACCAGAA CTCATTTGCA AACGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_213d TTTTTTTATG TTAACCAGAA CTCATTTGCA AACGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_85d_ TTTTTTTATG TTAACCAGAA CTCATTTGCA AACGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_132C TTTTTTTATG TTAACCAGAA CTCATTTGCA AACGGTGAAA ATTATTTTAA
Ec_DEC 8b TTTTTTTATG TTAACCAGAA CTCATTTGCA AACGGTGAAA ATTATTTTAA
aEPEC_237d TTTTTTTATG TTAACCAGAA CTCATTTGCA AACGGTGAAA ATTATTTTAA
Clustal Co *****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
aEPEC_190d ATTGAGTTCA GATTCAAAAC TGTTAACTCA AAATGTTGCT CAGGATCGCC
aEPEC_213d ATTGAGTTCA GATTCAAAAC TGTTAACTCA AAATGTTGCT CAGGATCGCC
aEPEC_85d_ ATTGAGTTCA GATTCAAAAC TGTTAACTCA AAATGTTGCT CAGGATCGCC
aEPEC_132C ATTGAGTTCA GATTCAAAAC TGTTAACTCA AAATGTTGCT CAGGATCGCC
Ec_DEC 18b ATTGAGTTCA GATTCAAAAC TGTTAACTCA AAATGTTGCT CAGGATCGCC
aEPEC_237d ATTGAGTTCA GATCAATGTA TGTTAACTTG AAATGCCGCT CAGGATCGCC
Clustal Co ***** ** * ***** ***** ** *****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
aEPEC_190d TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTTCCAGTAT TTCTAAATCA
aEPEC_213d TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTTCCAGTAT TTCTAAATCA
aEPEC_85d_ TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTTCCAGTAT TTCTAAATCA
aEPEC_132C TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTTCCAGTAT TTCTAAATCA
EC_DEC 18b TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTTCCAGTAT TTCTAAATCA
aEPEC_237d TTTTTTATAC GTTGAAAACA GGTGAAACTG TTTCCAGTAT TTCTAAATCA
Clustal Co *****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
aEPEC_190d CAAGGTATCA GTTTATCCGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
aEPEC_213d CAAGGTATCA GTTTATCCGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
aEPEC_85d_ CAAGGTATCA GTTTATCCGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
aEPEC_132C CAAGGTATCA GTTTATCCGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
Ec_DEC 18b CAAGGTATCA GTTTATCCGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
aEPEC_237d CAAGGTATCA GTTTATCCGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
Clustal Co *****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
aEPEC_190d TTCCGAAAGC GAAATGCTGA AGGCTGCGCC TGGCCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_213d TTCCGAAAGC GAAATGCTGA AGGCTGCGCC TGGCCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_85d_ TTCCGAAAGC GAAATGCTGA AGGCTGCGCC TGGCCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_132C TTCCGAAAGC GAAATGCTGA AGGCTGCGCC TGGCCAGCAG ATCATTTTGC
Ec_DEC 18b TTCCGAAAGC GAAATGCTGA AGGCTGCGCC TGGCCAGCAG ATCATTTTGC
aEPEC_237d TTCCGAAAGC GAAATGCTGA AGGCTGCGCC TGGCCAGCAG ATCATTTTGC
Clustal Co *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            260       270       280       290       300
aEPEC_190d  CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATGGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
aEPEC_213d  CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATGGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
aEPEC_85d_  CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATGGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
aEPEC_132C  CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATGGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
Ec_DEC 18b  CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATGGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
aEPEC_237d  CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATGGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ...
            310
aEPEC_190d  GCACCTCTTG TTG
aEPEC_213d  GCACCTCTTG TTG
aEPEC_85d_  GCACCTCTTG TTG
aEPEC_132C  GCACCTCTTG TTG
Ec_DEC 18b  GCACCTGTTG TTG
aEPEC_237d  GCACCTCTTG TTG
Clustal Co  ***** ***

```

NOTA: Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

FIGURA 11 - ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DO AMPLICON DE aEPEC 86D COM O GENE DA INTIMINA GAMA DE *E. coli* ESTIRPE ECOR 37

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            10       20       30       40       50
16540_86d_  TTTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
gi|3941713  TTTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            60       70       80       90      100
16540_86d_  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TGATAGCTAT CAGAATCGCC
gi|3941713  ATTGGGTTTCG GATTCAAAAC TGTTAACTCA TGATAGCTAT CAGAATCGCC
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            110      120      130      140      150
16540_86d_  TTTTTTATAC GTTGAAAAC TGTGAAAAC TGCCGATCT TTCTAAATCG
gi|3941713  TTTTTTATAC GTTGAAAAC TGTGAAAAC TGCCGATCT TTCTAAATCG
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            160      170      180      190      200
16540_86d_  CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
gi|3941713  CAAGATATTA ATTTATCGAC GATTTGGTCG TTGAATAAGC ATTTATACAG
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            210      220      230      240      250
16540_86d_  TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
gi|3941713  TTCTGAAAGC GAAATGATGA AGGCCGCGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
Clustal Co  *****

```



```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                260       270       280       290       300
16540_86d_    CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CACTACCACT TTTAGGTTTCG
gi|3941713    CACTCAAAAA ACTTCCCTTT GAATACAGTG CACTACCACT TTTAGGTTTCG
Clustal Co    *****

```

.....|.....| ...

```

                310
16540_86d_    GCACCTCTTG TTG
gi|3941713    GCACCTCTTG TTG
Clustal Co    *****

```

NOTA: Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

FIGURA 12 - ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DO AMPLICON DE aEPEC 28D COM O GENE DA INTIMINA EPSILON DE *E. coli*

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                10       20       30       40       50
aEPEC_28d_    TTTTTTATG TTAATCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
E_coli        TTTTTTATG TTAACCAGAA TTCATTTGCA AATGGTGAAA ATTATTTTAA
Clustal Co    *****

```

.....|.....||....||....||....||....|

```

                60       70       80       90       100
aEPEC_28d_    ATTGAGTTCA GATCAANGAN TGTTAACTCA AAATGCCGCT CAGGATCGCC
E_coli        ATTGAGTTCA GATTCAAAAC TGTTAACTCA AAATGCCGCT CAGGATCGCC
Clustal Co    *****

```

.....|.....||....||....||....||....|

```

                110      120      130      140      150
aEPEC_28d_    TTTTTTATAC GTTAAAAACA GGTGAAACTG TTGCCAATAT TTCTAAATCA
E_coli        TTTTTTATAC GTTAAAAACA GGTGAAACTG TTGCCAATAT TTCTAAATCA
Clustal Co    *****

```

.....|.....||....||....||....||....|

```

                160      170      180      190      200
aEPEC_28d_    CAGGGGATCA GTTTATCGGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
E_coli        CAGGGGATCA GTTTATCGGT AATTTGGTCA CTGAATAAAC ATTTATACAG
Clustal Co    *****

```

.....|.....||....||....||....||....|

```

                210      220      230      240      250
aEPEC_28d_    CTCCGAAAGC GAAATGATGA AGGCTGGGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
E_coli        CTCCGAAAGC GAAATGATGA AGGCTGGGCC TGGTCAGCAG ATCATTTTGC
Clustal Co    *****

```

.....|.....||....||....||....||....|

```

                260      270      280      290      300
aEPEC_28d_    CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATAGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
E_coli        CACTCAAAAA ACTGTCTGTT GAATATAGTG CCTTACCTGT CTTAGGTTTCG
Clustal Co    *****

```

.....|.....| ...

```

                310
aEPEC_28d_    GCACCTCTTG TTG
E_coli        GCACCTGTTG TTG
Clustal Co    *****

```

NOTA: Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

TABELA 15 – SEQÜÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE EIEC/*Shigella* - *ipaH*

Amostra	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
25d	<i>Shigella sonnei</i> Ss046- antígeno plasmidial de invasão	884	0,0	100%
27d	<i>Shigella sonnei</i> Ss046- antígeno plasmidial de invasão	884	0,0	100%
29d	<i>Shigella flexneri</i> IpaH 9.8	884	0.0	100%

FIGURA 13 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE EIEC/*Shigella* COM O GENE *ipaH* DE *Shigella*

```

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              10          20          30          40          50
Shigella 1  CATGGCTGGA AAAACTCAGT GCCTCTGCGG AGCTTCGACA GCAGTCTTTC
Shigella 2  CATGGCTGGA AAAACTCAGT GCCTCTGCGG AGCTTCGACA GCAGTCTTTC
gi|2408078  CATGGCTGGA AAAACTCAGT GCCTCTGCGG AGCTTCGACA GCAGTCTTTC
EIEC_ 29 d  CATGGCTGGA AAAACTCAGT GCCTCTGCGG AGCTTCGACA GCAGTCTTTC
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              60          70          80          90          100
Shigella 1  GCTGTTGCTG CTGATGCCAC TGAGAGCTGT GAGGACCGTG TCGCGCTCAC
Shigella 2  GCTGTTGCTG CTGATGCCAC TGAGAGCTGT GAGGACCGTG TCGCGCTCAC
gi|2408078  GCTGTTGCTG CTGATGCCAC TGAGAGCTGT GAGGACCGTG TCGCGCTCAC
EIEC_ 29 d  GCTGTTGCTG CTGATGCCAC TGAGAGCTGT GAGGACCGTG TCGCGCTCAC
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              110         120         130         140         150
Shigella 1  ATGGAACAAT CTCCGAAAA CCCTCCTGGT CCATCAGGCA TCTGAAGGCC
Shigella 2  ATGGAACAAT CTCCGAAAA CCCTCCTGGT CCATCAGGCA TCTGAAGGCC
gi|2408078  ATGGAACAAT CTCCGAAAA CCCTCCTGGT CCATCAGGCA TCAGAAGGCC
EIEC_ 29 d  ATGGAACAAT CTCCGAAAA CCCTCCTGGT CCATCAGGCA TCAGAAGGCC
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              160         170         180         190         200
Shigella 1  TTTTCGATAA TGATACCGGC GCTCTGCTCT CCCTGGGCAG GGAAATGTTC
Shigella 2  TTTTCGATAA TGATACCGGC GCTCTGCTCT CCCTGGGCAG GGAAATGTTC
gi|2408078  TTTTCGATAA TGATACCGGC GCTCTGCTCT CCCTGGGCAG GGAAATGTTC
EIEC_ 29 d  TTTTCGATAA TGATACCGGC GCTCTGCTCT CCCTGGGCAG GGAAATGTTC
Clustal Co  *****

```

```

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              210         220         230         240         250
Shigella 1  CGCCTCGAAA TTCTGGAGGA CATTGCCCGG GATAAAGTCA GAACTCTCCA
Shigella 2  CGCCTCGAAA TTCTGGAGGA CATTGCCCGG GATAAAGTCA GAACTCTCCA
gi|2408078  CGCCTCGAAA TTCTGGAGGA CATTGCCCGG GATAAAGTCA GAACTCTCCA
EIEC_ 29 d  CGCCTCGAAA TTCTGGAGGA CATTGCCCGG GATAAAGTCA GAACTCTCCA
Clustal Co  *****

```

```

                260          270          280          290          300
Shigella 1  TTTTGTGGAT GAGATAGAAG TCTACCTGGC CTTCCAGACC ATGCTCGCAG
Shigella 2  TTTTGTGGAT GAGATAGAAG TCTACCTGGC CTTCCAGACC ATGCTCGCAG
gi|2408078  TTTTGTGGAT GAGATAGAAG TCTACCTGGC CTTCCAGACC ATGCTCGCAG
EIEC_ 29 d  TTTTGTGGAT GAGATAGAAG TCTACCTGGC CTTCCAGACC ATGCTCGCAG
Clustal Co  *****
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                310          320          330          340          350
Shigella 1  AGAAACTTCA GCTCTCCACT GCCGTGAAGG AAATGCGTTT CTATGGCGTG
Shigella 2  AGAAACTTCA GCTCTCCACT GCCGTGAAGG AAATGCGTTT CTATGGCGTG
gi|2408078  AGAAACTTCA GCTCTCCACT GCCGTGAAGG AAATGCGTTT CTATGGCGTG
EIEC_ 29 d  AGAAACTTCA GCTCTCCACT GCCGTGAAGG AAATGCGTTT CTATGGCGTG
Clustal Co  *****
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                360          370          380          390          400
Shigella 1  TCGGGAGTGA CAGCAAATGA CCTCCGCACT GCCGAAGCCA TGGTCAGAAG
Shigella 2  TCGGGAGTGA CAGCAAATGA CCTCCGCACT GCCGAAGCCA TGGTCAGAAG
gi|2408078  TCGGGAGTGA CAGCAAATGA CCTCCGCACT GCCGAAGCCA TGGTCAGAAG
EIEC_ 29 d  TCGGGAGTGA CAGCAAATGA CCTCCGCACT GCCGAAGCCA TGGTCAGAAG
Clustal Co  *****
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                410          420          430          440          450
Shigella 1  CCGTGAAGAG AATGAATTTA CGGACTGGTT CTCCTCTGG GGACCATGGC
Shigella 2  CCGTGAAGAG AATGAATTTA CGGACTGGTT CTCCTCTGG GGACCATGGC
gi|2408078  CCGTGAAGAG AATGAATTTA CGGACTGGTT CTCCTCTGG GGACCATGGC
EIEC_ 29 d  CCGTGAAGAG AATGAATTTA CGGACTGGTT CTCCTCTGG GGACCATGGC
Clustal Co  *****
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                460          470          480          490
Shigella 1  ATGCTGTACT GAAGCGTACG GAAGCTGACC GCTGGGCGCT
Shigella 2  ATGCTGTACT GAAGCGTACG GAAGCTGACC GCTGGGCGCT
gi|2408078  ATGCTGTACT GAAGCGTACG GAAGCTGACC GCTGGGCGCT
EIEC_ 29 d  ATGCTGTACT GAAGCGTACG GAAGCTGACC GCTGGGCGCT
Clustal Co  *****

```

TABELA 16 – SEQÜÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE EIEC/*Shigella - ial*

Amostra	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
25d	<i>Shigella sonnei</i> Ss046 – plasmídeo pSS_046	782	0,0	100%
27d	<i>Shigella sonnei</i> Ss046 – plasmídeo pSS_046	782	0,0	100%
29d	<i>Shigella flexneri</i> – plasmídeo pINV_F6_M1382	767	0.0	99%

FIGURA 14 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE EIEC/*Shigella* COM O GENE *ial* DE *Shigella*

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10          20          30          40          50
NCBIspa9_1 GGTGGGGTAT CCTGTCTAAG GCCTTGATTG AACAAATATAT CAATGTTCCCT
Shigella 1 GGTGGGGTAT CCTGTCTAAG GCCTTGATTG AACAAATATAT CAATGTTCCCT
Shigella 2 GGTGGGGTAT CCTGTCTAAG GCCTTGATTG AACAAATATAT CAATGTTCCCT
EIEC_ 29 d GGTGGGGGAT CCTGTCTAAG GCCTTGATTG AACAAATATAT CAATGTTCCCT
Clustal Co ***** ** ***** ***** ***** ***** *****

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60          70          80          90          100
NCBIspa9_1 GCTTAGATGA TGGAGGTAAT GTGTCTGATA TAGTTTATAT GGGTAATAAG
Shigella 1 GCTTAGATGA TGGAGGTAAT GTGTCTGATA TAGTTTATAT GGGTAATAAG
Shigella 2 GCTTAGATGA TGGAGGTAAT GTGTCTGATA TAGTTTATAT GGGTAATAAG
EIEC_ 29 d GCTTAGATGA TGGAGGTAAT GTGTCTGATA TAGTTTATAT GGGTAATAAG
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      110         120         130         140         150
NCBIspa9_1 GCTCTTTATT TAATCCTTAT CTTTTCTTA TGGCCAGTAG GTATAGCTAC
Shigella 1 GCTCTTTATT TAATCCTTAT CTTTTCTTA TGGCCAGTAG GTATAGCTAC
Shigella 2 GCTCTTTATT TAATCCTTAT CTTTTCTTA TGGCCAGTAG GTATAGCTAC
EIEC_ 29 d GCTCTTTATT TAATCCTTAT CTTTTCTTA TGGCCAGTAG GTATAGCTAC
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160         170         180         190         200
NCBIspa9_1 GGTTATTGGA TTATCTATTG GTTTGTTACA GACAGTGACT CAACTCCAAG
Shigella 1 GGTTATTGGA TTATCTATTG GTTTGTTACA GACAGTGACT CAACTCCAAG
Shigella 2 GGTTATTGGA TTATCTATTG GTTTGTTACA GACAGTGACT CAACTCCAAG
EIEC_ 29 d GGTTATTGGA TTAACTATTG GTTTATTACA GACAGTGACT CAACTTCAAG
Clustal Co ***** ** ***** ** ***** ***** *****

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      210         220         230         240         250
NCBIspa9_1 AGCAGACACT TCCTTTTGGT ATAAAGCTTA TAGGTGTCTC AATATCTTTG
Shigella 1 AGCAGACACT TCCTTTTGGT ATAAAGCTTA TAGGTGTCTC AATATCTTTG
Shigella 2 AGCAGACACT TCCTTTTGGT ATAAAGCTTA TAGGTGTCTC AATATCTTTG
EIEC_ 29 d AGCAGACACT TCCTTTTGGT ATAAAGCTTA TAGGTGTCTC AATATCTTTG
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      260         270         280         290         300
NCBIspa9_1 CTACTTCTTT CTGGATGGTA TGGTGAGGTT TTATTGTCTT TTTGTCATGA
Shigella 1 CTACTTCTTT CTGGATGGTA TGGTGAGGTT TTATTGTCTT TTTGTCATGA
Shigella 2 CTACTTCTTT CTGGATGGTA TGGTGAGGTT TTATTGTCTT TTTGTCATGA
EIEC_ 29 d CTACTTCTTT CTGGATGGTA TGGTGAGGTT TTATTGTCTT TTTGTCATGA
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                310          320          330          340          350
NCBIspa9_1  AATAATGTTT TTAATTAAGA GTGGGGTTTG ATGGACATTT CAAGCTGGTT
Shigella 1  AATAATGTTT TTAATTAAGA GTGGGGTTTG ATGGACATTT CAAGCTGGTT
Shigella 2  AATAATGTTT TTAATTAAGA GTGGGGTTTG ATGGACATTT CAAGCTGGTT
EIEC_ 29 d  AATAATGTTT TTAATTAACA GTGGGGTTTG ATGGACATTT CAAGCTGGTT
Clustal Co  ***** * ***** ***** *****
      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                360          370          380          390          400
NCBIspa9_1  CGAAAGTATT CATGTGTTTT TAATACTCCT GAACGGCGTT TTTTTTAGAT
Shigella 1  CGAAAGTATT CATGTGTTTT TAATACTCCT GAACGGCGTT TTTTTTAGAT
Shigella 2  CGAAAGTATT CATGTGTTTT TAATACTCCT GAACGGCGTT TTTTTTAGAT
EIEC_ 29 d  CGAAAGTATT CATGTGTTTT TAATACTCCT GAACGGCGTT TTTTTTAGAT
Clustal Co  ***** ***** ***** ***** *****
      ....|.....| .....|.....| .....|.....| ...
                410          420          430
NCBIspa9_1  TGGCTCCATT ATTTTCTTT CTTCCATTT TAA
Shigella 1  TGGCTCCATT ATTTTCTTT CTTCCATTT TAA
Shigella 2  TGGCTCCATT ATTTTCTTT CTTCCATTT TAA
EIEC_ 29 d  TGGCTCCATT ATTTTCTTC CTTCCATTT AAA
Clustal Co  ***** ***** ***** **

```

TABELA 17 – SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE EAEC

Amostra	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
18cs	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	857	0,0	98%
21cs	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	874	0,0	99%
56cs	<i>E. coli</i> - plasmídeo pO86A1	843	0,0	98%
66cs	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	877	0,0	99%
173cs	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	865	0,0	98%
179cs	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	857	0,0	98%
191cs	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	877	0,0	99%
226cs	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	803	0,0	95%
75d	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	814	0,0	96%
141d	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	792	0,0	95%
171d	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	857	0,0	98%
217d	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	814	0,0	96%
239d	<i>E. coli</i> estirpe 042 - plasmídeo pAA2 aat gene cluster	764	0,0	93%
245d	<i>E.coli</i> - plasmídeo pCVD 432	818	0,0	96%

Os plasmídeos pAA2 e pO86A estão associados com o padrão de aderência de estirpes de EAEC.

FIGURA 15 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DOS AMPLICONS DE EAEC COM UMA REGIÃO DO PLASMÍDEO CVD 432 UTILIZADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli* ENTEROAGREGATIVA

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
EAEC_191cs  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
gi|1052598  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_066cs  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_021cs  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_179cs  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_173cs  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_018cs  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_171 d  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_141 d  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_226cs  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_075 d  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_217 d  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_245 d  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_056cs  ATTCTTATTC TCTTGATATA GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
EAEC_239 d  ATTCTTATTC TCTTGATATC GAAGAGTTAG ATATTAATAA ACATAACAAT
Clustal Co *****
*****

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
EAEC_191cs  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAAATATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
gi|1052598  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAAATATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_066cs  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAAATATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_021cs  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAAATATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_179cs  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAATTATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_173cs  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAAATATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_018cs  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAAATATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_171 d  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAAATATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_141 d  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAATTATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_226cs  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAATTAGN ANGTTNAGGC AGTATATAAA
EAEC_075 d  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAATTAGN ANGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_217 d  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAATTAGA GGGTTA-GAN AGTATATAAA
EAEC_245 d  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAATTATA GGNTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_056cs  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAAATATA GGGTTAGGGC AGTATATAAA
EAEC_239 d  ATAAAAACGA TGTTACCAGA TATAATTATA GGGNTAGGGC AGTATATAAA
Clustal Co ***** **
***** **
* *
*****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110          120          130          140          150
EAEC_191cs CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
gi|1052598 CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_066cs CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_021cs CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_179cs CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_173cs CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_018cs CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_171 d CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_141 d CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_226cs CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_075 d CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_217 d CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_245 d CAACAATCAA TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCCATTTT TATTTATCAT
EAEC_056cs CAACAACCAG TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCAATTTT TATTTATCAT
EAEC_239 d CAACAATCAG TGGTTCTCAT CTATTACAGA CAGCAATTTT TATTTATCAT
Clustal Co ***** ** ***** ***** ***** ***** *****

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160          170          180          190          200
EAEC_191cs TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
gi|1052598 TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_066cs TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_021cs TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_179cs TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_173cs TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_018cs TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_171 d TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_141 d TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_226cs TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_075 d TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_217 d TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_245 d TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATAATAAA
EAEC_056cs TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATGATAAA
EAEC_239 d TATCCTATAA TCTTCTATCG GCTTATGAAG CAAAAATGCA GAATGATAAA
Clustal Co ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210          220          230          240          250
EAEC_191cs TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
gi|1052598 TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_066cs TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_021cs TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_179cs TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_173cs TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_018cs TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_171 d TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_141 d TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_226cs TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_075 d TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_217 d TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_245 d TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_056cs TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAGATGCTTA GTGAGAGGAA
EAEC_239 d TTGGATATTG CTAATTATTT AAAATATATT GAAATGCTTA GTGAGAGAAA
Clustal Co ***** ***** ***** ** ***** ***** **

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

```



```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                410          420          430          440          450
EAEC_191cs  TGTAGAGATG ATATATAATA TTTTACAAAA AATCAGGTTT GATATTGATG
gi|1052598  TGTAGAGATG ATATATAATA TTTTACAAAA AATCAGGTTT GATATTGATG
EAEC_066cs  TGTAGAGATG ATATATAATA TTTTACAAAA AATCAGGTTT GATATTGATG
EAEC_021cs  TGTAGAGATG ATATATAATA TTTTACAAAA AATCAGGNT  GATATTGATG
EAEC_179cs  TGTAGAGATG ATATATAATA TTTTACAAAA AATCAGGGNT  GATATTGATG
EAEC_173cs  TGTAGAGATG ATATATTATA TTTTACAAAA AATCAGGTTT  GATATTGATG
EAEC_018cs  TGTAGAGATG ATATATCATA TTTTACAAAA AATCAGGTGT  GATATTGATG
EAEC_171 d  TGTAGAGATG ATATATCATA TTTTACAAAA AATCAGGTGT  GATATTGATG
EAEC_141 d  TGTAGAGATG ATATATNATN TTTTACNCAA A-TCGGGGTN  GATATTGATG
EAEC_226cs  TGTAGAGATG ATATATCATA TTTTNCNAAA AATCANGTGG  GATATTGATG
EAEC_075 d  TGTAGAGATG ATATATCATA TTTTACAAAA AATCAGGGGG  ATATTTGATG
EAEC_217 d  TGTAGAGATG ATATATNATA TTTTNCNAAA AATCCGGTGN  GATATTGATG
EAEC_245 d  TGTAGAGATG ATATATAATA TTTTNCNAAA AATCAGGTNG  GNTATTGATG
EAEC_056cs  TGTAGAGATG AGATATAATA TATTGCAAAA AATCAGGNT  GATATTGATG
EAEC_239 d  TGTA-AGATG ANATATCATA TATTNNGAAA AATCNGNNGT  GCTNTTGATG
Clustal Co  **** *      * *      * *      * *      * *      * *      * *      * *
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                460          470          480          490
EAEC_191cs  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT TTACTGTCAG ATAAAATCTC
gi|1052598  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT TTACTGTCAG ATAAAATCTC
EAEC_066cs  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT TTACTGTCAG ATAAAATCTC
EAEC_021cs  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT TTACTGTCAG ATAAAATCTC
EAEC_179cs  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT TTACTGTCAG ATAAAATCTC
EAEC_173cs  TNCTTGAGGA GGAGGAAAAGT TTACTGTCAG ATAAAATCTC
EAEC_018cs  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT NTA CTGTCAG ATAAAATCTC
EAEC_171 d  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT NTA CTGTCAG ATAAAATCTC
EAEC_141 d  TCCTNGAGGA GGAGGAAAAGT TNA CTGGCCN ANAAAANCCC
EAEC_226cs  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT TTNA CTGTCNG ATAAAATCTC
EAEC_075 d  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT TTACTGTCAG ATAAAATCTC
EAEC_217 d  TCCTTGAGGA GGAGGAAAAGT TTACTGTCNG ATAAAATCTC
EAEC_245 d  TCCTTGAGGA GGAGGGAAGT TTACTGGCCG ATAAAATCTC
EAEC_056cs  CCCTTGAAGA GGGAGGAAGT NTA CTGTCAG ATAAGATTTC
EAEC_239 d  TCCTTGAGGG AGGAGGAAGT CTACNGTCCC ATAANATCTC
Clustal Co  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

TABELA 18 – SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE DAEC

Amostra	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
77cs	<i>E. coli</i> - genes de adesina fimbrial subunidade F1845	839	0.0	99%
133d	<i>E. coli</i> - genes de adesina fimbrial subunidade F1845	850	0.0	99%

FIGURA 16 – ALINHAMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS DAS AMOSTRAS 77CS e 133D, COM A REGIÃO CORRESPONDENTE O GENE *daaE*

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                10          20          30          40          50
gi|145696|  TTAGACCGTA CTGTTGTGTT ACCCCCTCAC AAAACTGAAC AGGTAATCAA
16630_133d TTAGACCGTA CTGTTGTGTT ACCCCCTCAC AAAACTGAAC AGGTAATCAA
16476_77CS TTAGACCGTA CTGTTGTGTT ACCCCCTCAC AAAACTGAAC AGGTAATCAA
Clustal Co *****

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                60          70          80          90         100
gi|145696|  TATGAAAAAA TTAGCGATAA TGGCCGCCGC CAGCATGATT TTCACTGTGG
16630_133d TATGAAAAAA TTAGCGATAA TGGCCGCCGC CAGCATGATT TTCACTGTGG
16476_77CS TATGAAAAAA TTAGCGATAA TGGCCGCCGC CAGCATGATT TTCACTGTGG
Clustal Co *****

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                110         120         130         140         150
gi|145696|  GCTCCGCGCA AGCCACGTTC CAAGCGAGCG GGACAACGGG TATTACCACA
16630_133d GCTCCGCGCA AGCCACGTTC CAAGCGAGCG GGACAACGGG TATTACCACA
16476_77CS GCTCCGCGCA AGCCACGTTC CAAGCGAGCG GGACAACGGG TATTACCACA
Clustal Co *****

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                160         170         180         190         200
gi|145696|  CTGACTGTGA CCGAAGAGTG CCGGGTGCAG GTCGGTAACG TTACCGCGAC
16630_133d CTGACTGTGA CCGAAGAGTG CCGGGTGCAG GTCGGTAACG TTACCGCGAC
16476_77CS CTGACTGTGA CCGAAGAGTG CCGGGTGCAG GTCGGTAACG TTACCGCGAC
Clustal Co *****

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                210         220         230         240         250
gi|145696|  GCTCGCGCGA AGCAAGCTAA AAGACGACAC GGCTATAGGG GTGATCGGGG
16630_133d GCTCGCGCGA AGCAAGCTAA AAGACGACAC GGCTATAGGG GTGATCGGGG
16476_77CS GCTCGCGCGA AGCAAGCTAA AAGACGACAC GGCTATAGGG GTGATCGGGG
Clustal Co *****

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                260         270         280         290         300
gi|145696|  TAACCGCTCT AGGATGCAAC GGCCTGCAGG CCGCGTTGCA GGCCGACCCA
16630_133d TAACCGCTCT AGGATGCAAC GGCCTGCAGA CCGCGTTGCA GGCCGACCCA
16476_77CS TAACCGCTCT AGGATGCAAC GGCCTGCAGA CCGCGTTGCA GGCCGACCCA
Clustal Co *****

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                310         320         330         340         350
gi|145696|  GACAACTACG ATGCGACAAA TCTATATATG ACTAGCCGCA ACCATGACAA
16630_133d GACAACTACG ATGCGACAAA TCTATATATG ACTAGCCGCA ACCATGACAA
16476_77CS GACAACTACG ATGCGACAAA TCTATATATG ACTAGCCGCA ACCATGACAA
Clustal Co *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                360          370          380          390          400

gi|145696| ACTTAATGTC AACTTAAAAG CCACAGATGG GTCCAGTTGG ACCTACGGGA
16630_133d ACTTAATGTC AACTTAAAAG CCACAGATGG GTCCAGTTGG ACCTACGGGA
16476_77CS ACTTAATGTC NAACTAAAAG CCACAGATGG GTCCAGTTGG ACCTACGGGA
Clustal Co *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                410          420          430          440          450

gi|145696| ACGGCGTGTT CTACAAAACC GAAGGCGGTA ACTGGGGTGG GCACGTTGGG
16630_133d ACGGCGTGTT CTACAAAACC GAAGGCGGTA ACTGGGGTGG GCACGTTGGG
16476_77CS ACGGCGTGTT CTACAAAAC- GAAGGCGGTA ACTGGGGTGG GCACGTTGGG
Clustal Co *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....
                460          470

gi|145696| ATCTCCGTGG ACGGGAACCA AACT
16630_133d ATCTCCGTGG ACGGGAACCA AACT
16476_77CS ATCTCCGTGG ACGGGAACCA AACT
Clustal Co *****

```

O seqüenciamento dos amplicons confirma a presença dos genes de virulência nas bactérias isoladas e a especificidade da PCR-Multiplex para DEC/*Shigella*.

6 DISCUSSÃO

A microbiota intestinal de humanos contém *E. coli* não patogênica. Assim, diferente de outros agentes de diarreia como por exemplo *Salmonella* e *Vibrio*, que podem ser isolados utilizando meios seletivos, as DEC não podem ser diferenciadas das *E. coli* não patogênicas pela cultura em meios seletivos. Provas bioquímicas também são insuficientes para diferenciá-las. Como alguns sorotipos de *E. coli* foram associados com DEC, a sorotipagem tem sido utilizada nos laboratórios clínicos como método para diferenciar as estirpes patogênicas (SILVA, 2006).

Entretanto existe um grande número de sorotipos de DEC (NATARO e KAPER, 1998), o que torna essa metodologia inadequada para a rotina devido ao elevado número de antisoros que deveriam ser utilizados, gerando custo elevado e intensa mão de obra para a realização dos ensaios. Além disso, o sorotipo não está diretamente associado com virulência (SALYERS e WHITT, 2002), o que torna a sorotipagem isoladamente insuficiente e não confiável para definir um isolado como patogênico. Recentemente foi mostrado que os marcadores sorotípicos não se correlacionam com genes específicos de virulência (YANG *et al.*, 2007). Ensaio imunológico para a detecção de toxinas e cultivo celular para verificar a produção de toxinas, o padrão de aderência ou a capacidade de invasão são úteis para identificar os patotipos de DEC (NATARO e KAPER, 1998; KARCH *et al.*, 1999), mas são ensaios caros, e não são adequados para a rotina dos laboratórios clínicos.

As DEC são distinguidas pelos seus mecanismos de patogenicidade. Vários genes de virulência têm sido identificados nos distintos patotipos (NATARO e KAPER, 1998), o que torna os métodos moleculares vantajosos para o uso no diagnóstico laboratorial dessas bactérias, uma vez que detectam diretamente os genes que determinam a patogenicidade. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método versátil, sensível e específico que tem sido amplamente utilizado para diagnóstico de doenças infecciosas (PERSING *et al.*, 1993), entretanto a realização de ensaios separados para a detecção dos genes de virulência de cada patotipo de DEC seria muito trabalhoso e caro.

A PCR-Multiplex para o diagnóstico das *Escherichia coli* diarreio gênicas foi aplicada neste estudo porque é um ensaio mais acurado que testes microbiológicos convencionais e que as provas sorológicas. Além disso, comparando-se com a PCR convencional, a multiplex se torna mais prática, pois reduz o número de testes necessários para a identificação das seis categorias de DEC, o que facilita a análise e reduz o custo. Diversos protocolos de PCR-Multiplex estão descritos e têm se mostrado úteis para o diagnóstico de DEC (LOPEZ-SAUCEDO *et al.*, 2003; TOMA *et al.*, 2003); ARANDA, FAGUNDES-NETO e SCALETSKY, 2004; ARANDA *et al.*, 2007; (KIMATA *et al.*, 2005; PERSSON *et al.*, 2007), mas não detectam os seis patótipos de DEC, o que foi possível utilizando os dois sistemas utilizados nesse trabalho.

O dois sistemas de PCR-Multiplex utilizados neste trabalho foram desenvolvidos devido ao risco de formação de dímeros entre os oligonucleotídeos iniciadores. A seleção dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizada através de levantamento de dados sobre os genes alvos pesquisados para cada DEC, verificação das temperaturas de *melting*, dos tamanhos dos fragmentos gerados e da possível formação de dímeros de iniciadores (software IDT DNA - BioWeb). Também foi incluído um controle interno da reação com a adição dos iniciadores para rDNA 16S. A partir da análise dos dados descritos acima, os oligonucleotídeos foram divididos em dois sistemas, onde a única diferença é a temperatura de anelamento, num deles é 55 e no outro é 58°C (Tabelas 3 e 4).

O método mostrou-se específico, amplificando apenas DNA das estirpes de DEC utilizadas como controles positivos e de *Shigella sonnei*, o que era esperado uma vez que esta bactéria compartilha os genes de virulência com a EIEC (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004), mas não o de outras bactérias (Figura 3). Os resultados da PCR-Multiplex foram confirmados com o seqüenciamento dos amplicons (Tabelas 14 a 19 e Figuras 6 a 18).

Das 67 amostras positivas na etapa de triagem (Tabelas 7 e 8) o isolamento das colônias de DEC/*Shigella* foi possível em apenas 40 (59,7%). Isto pode ocorrer devido à presença de um grande número de outros coliformes nas amostras e a elevada sensibilidade da PCR (PATON *et al.*, 1996). Sendo assim, a reação positiva na PCR

numa mistura de bactérias não garante o isolamento de DEC. Persson e colaboradores (2007), também depararam com resultados similares verificando em 11 amostras resultados positivos na PCR realizada com DNA extraído da região de crescimento confluyente. Entretanto, quando bactérias da região de crescimento confluyente foram inoculadas em uma nova placa para a obtenção de colônias isoladas e identificação de DEC, somente 5 das amostras apresentaram resultados positivos provavelmente devido ao baixo número de células de DEC entre as colônias confluentes (PERSSON *et al.*, 2007). Esse resultado também é ilustrado por outro trabalho (IIJIMA *et al.*, 2007). Observaram que entre 81 culturas positivas para DEC, em 48 (59,3%) a proporção dessas bactérias na microbiota era igual ou inferior a 10%, mostrando que há uma baixa probabilidade de detecção de colônias de DEC nessas situações (IIJIMA *et al.*, 2007).

Neste trabalho a frequência de amostras positivas para DEC (19/250, 7,6%) foi a mesma entre o grupo controle e os indivíduos com diarreia (Tabelas 5 e 6, Gráficos 2 e 3). Este resultado foi inesperado e contrasta com o descrito na literatura especializada, que mostra frequências de DEC maiores nos indivíduos com diarreia (ORLANDI *et al.*, 2006; BUERIS *et al.*, 2007, HIEN *et al.*, 2008). Em parte esses resultados podem ser consequência do período do ano em que as amostras foram coletadas, março a outubro, meses de temperatura média mais baixa, uma vez que as doenças diarreicas são mais comuns nos meses de temperaturas mais elevadas (ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004). Outra hipótese plausível para as diferenças encontradas baseia-se nas características da amostra. Neste trabalho foram considerados como parte do grupo de indivíduos com diarreia pessoas que buscaram auxílio médico com base em sinais e sintomas clínicos, enquanto outros trabalhos utilizaram critérios mais restritivos, como a emissão de três ou mais fezes aquosas no período de 24 horas, presença de sangue nas fezes, entre outros sinais (BUERIS *et al.* 2007). Esta hipótese é reforçada pelos resultados de um estudo no qual foram analisadas amostras de indivíduos com queixas de diarreia sem utilizar nenhum outro critério para classificar as amostras como diarreicas. As frequências de DEC encontradas foram similares, 9,4% nos doentes e 6,8% nos controles (NATARO *et al.*, 2006).

A freqüência de DEC (7,6%) observada nos indivíduos com diarreia difere daquelas descritas por ARANDA et al (2004, 2007), FRANZOLIN et al (2005), BUERIS et al (2007) e ORLANDI et al. (2006) em trabalhos realizados em São Paulo, Bahia e Rondônia, que encontraram taxas de 16% a 25%. Esta diferença pode ser devida às características das amostras estudadas por aqueles autores, que além de usar critérios mais rígidos para definir diarreia, incluíam apenas crianças enquanto que a amostra avaliada neste estudo incluiu apenas pacientes ambulatoriais e adultos e crianças. As doenças diarreicas são mais comuns em crianças (NATARO e KAPER, 1998) o que também poderia explicar as diferenças observadas. Como citado acima, outro fator que poderia estar envolvido é o período do ano em que foram realizadas as coletas. Aranda et al (2007) coletaram as amostras entre os meses de janeiro a março, período em que a temperatura é mais elevada e quando as doenças diarreicas apresentam maior incidência, e na Bahia e Rondônia as temperaturas são mais elevadas que as observadas no sul do país.

Quanto à caracterização bioquímica, todas as estirpes isoladas apresentaram perfil idêntico para as seguintes provas: orto-nitrofenil- β D-galactopiranosidase, utilização do citrato, produção de H_2S , urease, triptofano desaminase, produção de indol, produção de acetoína - Voges Proskauer, gelatinase, glucose, manitol, inositol, amigdalina, arabinose e citocromo oxidase (Tabelas 7 e 8). A variabilidade observada nas demais provas reflete-se nos 13 diferentes biotipos observados para as 38 estirpes de DEC. O biotipo mais freqüente foi 5144572 que incluiu 14 DEC, sendo 7 EPEC, 3 STEC, 2 EAEC e 2 DAEC. Todas as estirpes de DEC, exceto DAEC, apresentaram variação no perfil de utilização de aminoácidos e carboidratos. As maiores variações das estirpes de EPEC foram em relação a ornitina descarboxilase e sacarose, e as menores em relação à arginina dihidrolase, sorbitol e melobiose. Duas estirpes de STEC tiveram perfil diferenciado, uma delas em relação à ornitina descarboxilase e à sacarose e a outra apenas à sacarose. A variação do perfil de fermentação de sacarose também foi encontrado em outro trabalho realizado em São Paulo (GUTH *et al.*, 2002). No caso da EIEC, o perfil bioquímico obtido no API 20E (biotipo 1144171) permitiu diferenciar esta bactéria de *S. sonnei* (Tabela 8) biotipo 1104112, e indicou que a última

é bioquimicamente mais inerte que a *E. coli* enteroinvasora. As EAEC foram mais heterogêneas quanto à ornitina descarboxilase, ramnose e sacarose e variaram, em menor grau, quanto à lisina descarboxilase, melobiose e lactose. Estes dados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8 e demonstram que o bioquimismo não pode ser utilizado isoladamente para o diagnóstico das DEC, confirmando dados de literatura que mostram a versatilidade das estirpes de *E. coli* (NATARO *et al.*, 2007).

A incidência das DEC encontradas neste trabalho foi similar à encontrada em outros trabalhos (GOMES *et al.*, 1991; REGUA-MANGIA *et al.*, 2004; FRANZOLIN *et al.*, 2005). Os patótipos isolados com maior frequência foram EAEC e aEPEC, o que também foi verificado em trabalho realizado em Salvador, BA (BUERIS *et al.*, 2007). A incidência destes dois patótipos foi inversa em relação aos controles saudáveis e às amostras diarréicas (Gráfico 3), ou seja, nos controles saudáveis a incidência de EAEC foi cerca de 50% maior que a observada nas amostras diarréicas, e para aEPEC cerca de 50% menor.

A ausência de tEPEC na amostra analisada confirma dados de outros trabalhos recentes realizados no Brasil (BUERIS *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2004; FRANZOLIN *et al.*, 2005), os quais mostram uma diminuição na incidência deste patótipo de *E. coli*. A razão para esta queda não é clara, mas pode ser uma consequência das políticas de saúde pública, com reflexos na melhoria das condições sanitárias e controle de infecções hospitalares (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002). A situação atual do Brasil quanto à incidência de EPEC está tornando-se similar àquela presente nos países desenvolvidos, onde a presença de tEPEC é rara e de aEPEC é relativamente frequente, e mostra a necessidade de mais estudos para esclarecer a patogenia desta bactéria. Neste estudo, aEPEC foi o patótipo mais frequente entre os indivíduos com diarreia, e ocorreu tanto em crianças como em adultos (Tabela 6). A principal característica das EPEC é a presença da intimina, requerida para a formação das lesões *attaching and effacing*. A intimina é uma proteína altamente variável com pelo menos 10 variantes descritas. A região N-terminal dessa proteína é mais conservada enquanto a região C-terminal apresenta variabilidade. O papel dos diferentes tipos de intimina no processo de patogênese ainda não é bem compreendido,

mas parece estar relacionado com o tropismo para os tecidos do hospedeiro (ZHANG et al., 2002). Os iniciadores utilizados neste trabalho são complementares a regiões do gene *eae* correspondentes ao domínio N-terminal da intimina. Ainda assim os resultados do sequenciamento dos amplicons sugerem a presença de diferentes tipos de intimina, o que deve ser melhor investigado.

As EAEC são patógenos emergentes e causa de diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Têm sido isoladas com elevada frequência em alguns países (RATCHTRACHENCHAI *et al.*, 2004; MOYO *et al.*, 2007). Este foi o patotipo mais comum no grupo controle, e o segundo entre os indivíduos com diarreia. Esses organismos são heterogêneos em termos de virulência (NATARO e KAPER, 1998), e uma investigação sobre os genes associados com virulência nas estirpes isoladas neste trabalho poderia mostrar diferenças em termos de patogenicidade entre elas e auxiliar na compreensão da sua epidemiologia.

As STEC também foram encontradas tanto no grupo controle (3 estirpes) quando nos doentes (1 estirpe). As estirpes isoladas do grupo controle apresentaram os genótipos *stx₂* (2 estirpes) ou *stx₁* *eae*. A estirpe 150cs (*stx₂*) foi negativa para o teste de citotoxicidade em células Vero indicando que é incapaz de produzir Stx embora apresente o gene *stx₂*, detectado por PCR (Figura 4). STEPHAN e HOELZLE (2000) mostraram que entre os portadores saudáveis de STEC há uma grande proporção de estirpes que contém formas menos virulentas de *stx₂*, e esse poderia ser o caso da outra estirpe que contém *stx₂*. As STEC com genótipo *stx₁* *eae* têm sido isoladas no país de casos de diarreia não complicada (GUTH *et al.*, 2002), e não se pode excluir a possibilidade de que o portador dessa bactéria tenha apresentado diarreia anteriormente e continue excretando o patógeno, o que ocorre durante cerca de 30 a 50 após a cura (SWERDLOW e GRIFFIN, 1997). A STEC isolada de caso de diarreia (10d) apresentou o genótipo *stx₁* *stx₂* *ehxA*. A presença de *stx₂* associado a *eae* está associada com maior virulência (BOERLIN et al., 1999), o que explica este achado no grupo dos doentes.

EIEC foi encontrada apenas em amostras diarreicas, reforçando sua importância como causa de diarreia. Dos três isolados positivos para os genes *ipa* e *ial*, 2 foram

identificados como *S. sonnei* através das provas bioquímicas. Isto mostra que no caso da positividade dos genes *ipaH* e *ial* é de suma importância que se faça associação dos dados da microbiologia convencional e da biologia molecular.

Apenas duas amostras foram positivas para DAEC, cuja incidência pode estar sendo subestimada, uma vez que estirpes de DAEC apresentam perfil genotípico bastante heterogêneo (LOPES *et al.*, 2005), e neste trabalho apenas o gene *daaE* foi pesquisado.

Os testes estatísticos (Tabela 13), mostram que não houve diferença significativa entre os patótipos de DEC isolados do grupo controle e dos doentes, o que também é observado no cálculo do índice de patogenicidade que mostrou valores baixos indicando que nenhuma DEC está associada significativamente com diarreia. Resultados similares foram observados por NATARO e colaboradores em New Haven, Connecticut.

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (Tabelas 10, 11 e 12) mostra que todas as estirpes de DEC isoladas foram sensíveis à amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina/tazobactam (β -lactâmicos associados à inibidores de β -lactamases); cefepime, cefoxitina, ceftazidime (cefalosporinas); ciprofloxacina (fluorquinolona) e imipenem (carbapenem). A resistência à ampicilina e tetraciclina, foram as mais comuns, observadas em 13 e 11 das estirpes, respectivamente. Quatro estirpes de aEPEC apresentaram resistência a 2 ou mais antimicrobianos: 65cs (AMP, ATM, KF, CTX, CRO e TE), 200d (AMP, KF e STX), 213d (AMC e TE) e 237d (STX e TE). Entre as STEC, a estirpe 107cs apresentou resistência (KF e TE). No Brasil, a resistência a tetraciclina foi detectada em grande parte de estirpes de STEC isoladas de humanos (CERGOLE-NOVELLA *et al.*, 2006). As duas estirpes de *S. sonnei* foram resistentes à ampicilina e intermediárias à cefalotina, enquanto que a EIEC apresentou sensibilidade a todos os antibióticos. Seis estirpes de EAEC apresentaram resistência: 18cs (AMP e TE), 56cs (STX e TE), 226cs (AMP e CN), 75d (AMP, KF e CN), 239d (AMP e TZP) e 245d (AMP e TE). Uma das estirpes de DAEC (77cs) apresentaram perfil intermediário para cefalotina, no entanto a 133d apresentou resistência a diversos antimicrobianos (AMP, KF, STX e TE). A resistência de estirpes de DAEC a múltiplos antimicrobianos foi

observada por LOPES et al (2005) que sugeriram que a multiresistência de DAEC pode estar associada à transferência de plasmídios conjugativos alguns dos quais codificam genes de adesão e podem ser importantes na epidemiologia desses organismos (LOPES *et al.*, 2005).

7 CONCLUSÕES

7.1 O protocolo de PCR-Multiplex empregado mostrou-se sensível e específico para a detecção de DEC/*Shigella*.

7.2 A positividade das amostras do grupo controle na etapa de triagem foi de 13,6% e para os indivíduos com diarreia 13,2%, entretanto, em ambos os grupos, as colônias de DEC só foram isoladas de 7,6% (19/250) das amostras devido ao baixo número de colônias presentes. Este achado reforça a importância do uso de métodos de amplificação no diagnóstico das infecções causadas por DEC.

7.3 Os seguintes patótipos de DEC foram isolados: no grupo controle - EAEC (3,2%), aEPEC (2,8%), STEC (1,2%) e DAEC (0,4%); nos indivíduos doentes – aEPEC (4%), EAEC (2,4%), STEC, DAEC e EIEC (0,4%); duas *Shigella sonnei* (0,8%) também foram isoladas. Nenhuma DEC foi associada significativamente com diarreia.

7.4 Apenas três (10d, 88cs e 107cs) das quatro estirpes de STEC foram positivas no ensaio de citotoxicidade em células Vero confirmando a produção de toxina Shiga. O gene que codifica a citotoxina subtilisina não foi detectada em nenhuma das estirpes. Os seguintes genótipos foram encontrados: *stx₁ stx₂ ehxA* (amostra 10d); *stx₂* (amostras 88cs e 150 cs) e *stx₁ eae* (amostra 107cs).

7.5 Apenas 13 das 38 estirpes de DEC foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados. A resistência mais frequentemente observada foi à ampicilina (14 estirpes) e tetraciclina (11 estirpes). Estirpes multirresistentes foram encontradas entre as EPEC (3), EAEC (2) e DAEC (1).

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. e LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402, 1997.
- ARANDA, K. R., FABBRICOTTI, S. H., FAGUNDES-NETO, U. e SCALETSKY, I. C. 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, n.2, Feb, p.145-50, 2007.
- ARANDA, K. R., FAGUNDES-NETO, U. e SCALETSKY, I. C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J Clin Microbiol**, v.42, n.12, Dec, p.5849-53, 2004.
- ARIKAWA, K., MERAZ, I. M., NISHIKAWA, Y., OGASAWARA, J. e HASE, A. Interleukin-8 secretion by epithelial cells infected with diffusely adherent *Escherichia coli* possessing Afa adhesin-coding genes. **Microbiol Immunol**, v.49, n.6, p.493-503, 2005.
- BAUER, M. E. e WELCH, R. A. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect Immun**, v.64, n.1, Jan, p.167-75, 1996.
- BERNET-CAMARD, M. F., COCONNIER, M. H., HUDAULT, S. e SERVIN, A. L. *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. **Infect Immun**, v.64, p.1918-1928, 1996.
- BETIS, F., BREST, P., HOFMAN, V., GUIGNOT, J., BERNET-CAMARD, M. F., ROSSI, B., SERVIN, A. e HOFMAN, P. The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. **Infect Immun**, v.71, n.3, Mar, p.1068-74, 2003.
- BEUTIN, L., GEIER, D., STEINRUCK, H., ZIMMERMANN, S. e SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **J Clin Microbiol**, v.31, n.9, Sep, p.2483-8, 1993.
- BILGE, S. S., CLAUSEN, C. R., LAU, W. e MOSELEY, S. L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J Bacteriol**, v.171, n.8, Aug, p.4281-9, 1989.

BOERLIN, P., MCEWEN, S. A., BOERLIN-PETZOLD, F., WILSON, J. B., JOHNSON, R. P. e GYLES, C. L. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **J Clin Microbiol**, v.37, n.3, Mar, p.497-503, 1999.

BUERIS, V., SIRCILI, M. P., TADDEI, C. R., SANTOS, M. F., FRANZOLIN, M. R., MARTINEZ, M. B., FERRER, S. R., BARRETO, M. L. e TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, Nov, p.839-44, 2007.

CANIZALEZ-ROMAN, A. e NAVARRO-GARCIA, F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. **Mol Microbiol**, v.48, n.4, May, p.947-58, 2003.

CDC. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach **MMWR**, v.55, p.1-2, 2006.

_____. **Multistate Outbreak of *E. coli* O157 Infections Linked to Topp's Brand Ground Beef Patties**. Disponível em: <www.cdc.gov/ecoli/2007/october/100207.html> Acesso em: 15 jan. 2008.

CERGOLE-NOVELLA, M. C., NISHIMURA, L. S., IRINO, K., VAZ, T. M., DE CASTRO, A. F., LEOMIL, L. e GUTH, B. E. Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. **FEMS Microbiol Lett**, v.259, n.2, Jun, p.234-9, 2006.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth international supplement**. Pennsylvania, v.26, 2006. 183 p.

COHEN, M. B., HAWKINS, J. A., WECKBACH, L. S., STANECK, J. L., LEVINE, M. M. e HECK, J. E. Colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* in travelers with and without diarrhea. **J Clin Microbiol**, v.31, n.2, Feb, p.351-3, 1993.

CZECZULIN, J. R., BALEPUR, S., HICKS, S., PHILLIPS, A., HALL, R., KOTHARY, M. H., NAVARRO-GARCIA, F. e NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.65, n.10, Oct, p.4135-45, 1997.

CZECZULIN, J. R., WHITTAM, T. S., HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA, F. e NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.67, n.6, Jun, p.2692-9, 1999.

DONNENBERG, M. S. e WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, v.107, n.5, p.539-548, 2001.

DREYFUS, L. A., HARVILLE, B., HOWARD, D. E., SHABAN, R., BEATTY, D. M. e MORRIS, S. J. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.8, Apr 15, p.3202-6, 1993.

ELIAS, W. P., UBER, A. P., TOMITA, S. K., TRABULSI, L. R. e GOMES, T. A. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol Infect**, v.129, n.1, Aug, p.49-55, 2002.

ELSINGHORST, E. A. e WEITZ, J. A. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. **Infect Immun**, v.62, n.8, Aug, p.3463-71, 1994.

ENDO, Y., TSURUGI, K., YUTSUDO, T., TAKEDA, Y., OGASAWARA, T. e IGARASHI, K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. **Eur J Biochem**, v.171, n.1-2, Jan 15, p.45-50, 1988.

FAGUNDES-NETO, U. **Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in infants: clinical aspects and small bowel morphological alterations**. Rev. Microbiol. São Paulo. 27: 117-119 p. 1996.

FARTHING, M. J. G. Diarrhoea: a significant worldwilde problem. **Int. J. Antimicrobial Agents**, v.14, p.65-69, 2000.

FRANKEL, G., PHILLIPS, A. D., ROSENSHINE, I., DOUGAN, G., KAPER, J. B. e KNOTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol Microbiol**, v.30, n.5, Dec, p.911-21, 1998.

FRANZOLIN, M. R., ALVES, R. C., KELLER, R., GOMES, T. A., BEUTIN, L., BARRETO, M. L., MILROY, C., STRINA, A., RIBEIRO, H. e TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, Jul, p.359-63, 2005.

FRIEDRICH, A. W., BIELASZEWSKA, M., ZHANG, W. L., PULZ, M., KUCZIUS, T., AMMON, A. e KARCH, H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **J Infect Dis**, v.185, n.1, Jan 1, p.74-84, 2002.

GAASTRA, W. e SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends Microbiol**, v.4, n.11, Nov, p.444-52, 1996.

GENTRY, M. K. e DALRYMPLE, J. M. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. **J Clin Microbiol**, v.12, p.361-366, 1980.

GIBOTTI, A., TANAKA, T. L., OLIVEIRA, V. R., TADDEI, C. R. e MARTINEZ, M. B. Molecular characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* ipa genes by PCR-RFLP analysis. **Braz. J. Microbiol.**, v.35, p.74-80, 2004.

GIRÃO, D. M., GIRÃO, V. B. C., IRINO, K. e GOMES, T. A. T. Classifying *Escherichia coli*. **Infect. Dis.**, v.12, n.8, 2006.

GOMES, T. A., IRINO, K., GIRAIO, D. M., GIRAIO, V. B., GUTH, B. E., VAZ, T. M., MOREIRA, F. C., CHINARELLI, S. H. e VIEIRA, M. A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg Infect Dis**, v.10, n.10, Oct, p.1851-5, 2004.

GOMES, T. A., RASSI, V., MACDONALD, K. L., RAMOS, S. R., TRABULSI, L. R., VIEIRA, M. A., GUTH, B. E., CANDEIAS, J. A., IVEY, C., TOLEDO, M. R. e ET AL. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. **J Infect Dis**, v.164, n.2, Aug, p.331-7, 1991.

GRAY, L. D. *Escherichia, Salmonella, Shigella, and Yersinia*. In: MURRAY, P. R. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM Press, 1995. *Escherichia, Salmonella, Shigella, and Yersinia*, p.450-456

GREENBERG, D. E., JIANG, Z. D., STEFFEN, R., VERENKER, M. P. e DUPONT, H. L. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. **J Infect Dis**, v.185, n.7, Apr 1, p.944-9, 2002.

GUTH, B. E., RAMOS, S. R., CERQUEIRA, A. M., ANDRADE, J. R. e GOMES, T. A. Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in Sao Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.8, Dec, p.1085-9, 2002.

HABIB, N. F. e JACKSON, M. P. Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga toxin genes. **J Bacteriol**, v.175, n.3, Feb, p.597-603, 1993.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.**, v.41, p.95-98, 1999.

HARRINGTON, S. M., DUDLEY, E. G. e NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v.254, n.1, Jan, p.12-8, 2006.

HARRIS, J. R., WACHSMUTH, I. K., DAVIS, B. R. e COHEN, M. L. High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. **Infect Immun**, v.37, n.3, Sep, p.1295-8, 1982.

HASAN, R. J., PAWELCZYK, E., URVIL, P. T., VENKATARAJAN, M. S., GOLUSZKO, P., KUR, J., SELVARANGAN, R., NOWICKI, S., BRAUN, W. A. e NOWICKI, B. J. Structure-function analysis of decay-accelerating factor: identification of residues important for binding of the *Escherichia coli* Dr adhesin and complement regulation. **Infect Immun**, v.70, n.8, Aug, p.4485-93, 2002.

HENDERSON, I. R., CZECZULIN, J., ESLAVA, C., NORIEGA, F. e NATARO, J. P. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.67, n.11, Nov, p.5587-96, 1999.

HENDERSON, I. R., HICKS, S., NAVARRO-GARCIA, F., ELIAS, W. P., PHILIPS, A. D. e NATARO, J. P. Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. **Infect Immun**, v.67, n.10, Oct, p.5338-44, 1999.

HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA, F., DESVAUX, M., FERNANDEZ, R. C. e ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.68, n.4, Dec, p.692-744, 2004.

HERNANDES, R. T., VIEIRA, M. A., CARNEIRO, S. M., SALVADOR, F. A. e GOMES, T. A. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. **J Clin Microbiol**, v.44, n.11, Nov, p.4214-7, 2006.

HIEN, B. T., SCHEUTZ, F., CAM, P. D., SERICHANTALERGS, O., HUONG, T. T., THU, T. M. e DALSGAARD, A. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. **J Clin Microbiol**, v.46, n.3, Mar, p.996-1004, 2008.

IJIMA, Y., TANAKA, S., MIKI, K., KANAMORI, S., TOYOKAWA, M. e ASARI, S. Evaluation of colony-based examinations of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool specimens: low probability of detection because of low concentrations, particularly during the early stage of gastroenteritis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.58, n.3, Jul, p.303-8, 2007.

JACKSON, M. P., NEILL, R. J., O'BRIEN, A. D., HOLMES, R. K. e NEWLAND, J. W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiol Lett**, v.44, p.109-114, 1987.

JENKINS, C., PERRY, N. T., CHEASTY, T., SHAW, D. J., FRANKEL, G., DOUGAN, G., GUNN, G. J., SMITH, H. R., PATON, A. W. e PATON, J. C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **J Clin Microbiol**, v.41, n.4, Apr, p.1775-8, 2003.

JERSE, A. E., YU, J., TALL, B. D. e KAPER, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.20, Oct, p.7839-43, 1990.

KAPER, J. B., NATARO, J. P. e MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v.2, n.2, Feb, p.123-40, 2004.

KARCH, H., BIELASZEWSKA, M., BITZAN, M. e SCHMIDT, H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.34, p.229-243, 1999.

_____. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Diagn. Microbiol. Infect.** , v.40, p.151-156, 2001.

KARMALI, M. A., STEELE, B. T., PETRIC, M. e LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, v.1, n.8325, Mar 19, p.619-20, 1983.

KESKIMAKI, M., EKLUND, M., PESONEN, H., HEISKANEN, T. e SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.40, p.151-156, 2001.

KIMATA, K., SHIMA, T., SHIMIZU, M., TANAKA, D., ISOBE, J., GYOBU, Y., WATAHIKI, M. e NAGAI, Y. Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **Microbiol Immunol**, v.49, n.6, p.485-92, 2005.

KOSEK, M., BERN, C. e GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ**, v.81, n.3, p.197-204, 2003.

LAN, R., ALLES, M. C., DONOHOE, K., MARTINEZ, M. B. e REEVES, P. R. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infect Immun**, v.72, n.9, Sep, p.5080-8, 2004.

LANATA, C. F. e MENDOZA, W. Improving diarrhoea estimates. **Inst Invest Nut**, p.1-48, 2002.

LE BOUGUENEC, C. e SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiol Lett**, v.256, n.2, Mar, p.185-94, 2006.

LOPES, L. M., FABBRICOTTI, S. H., FERREIRA, A. J., KATO, M. A., MICHALSKI, J. e SCALETISKY, I. C. Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. **J Clin Microbiol**, v.43, n.4, Apr, p.1968-72, 2005.

- LOPEZ-SAUCEDO, C., CERNA, J. F., VILLEGAS-SEPULVEDA, N., THOMPSON, R., VELAZQUEZ, F. R., TORRES, J., TARR, P. I. e ESTRADA-GARCIA, T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v.9, n.1, Jan, p.127-31, 2003.
- LORTIE, L. A., DUBREUIL, J. D. e HAREL, J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. **J Clin Microbiol**, v.29, n.3, Mar, p.656-9, 1991.
- LUDWIG, A., BAUER, S., BENZ, R., BERGMANN, B. e GOEBEL, W. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. **Mol Microbiol**, v.31, n.2, Jan, p.557-67, 1999.
- LUSCHER, D. e ALTWEGG, M. Detection of *Shigella*, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. **Mol Cell Probes**, v.8, n.4, Aug, p.285-90, 1994.
- MAINIL, J. G. e DAUBE, G. 2005Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **J. Appl. Microbiol.**, v.98, p.1332-1344, 2005.
- MCDANIEL, T. K., JARVIS, K. G., DONNENBERG, M. S. e KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.5, Feb 28, p.1664-8, 1995.
- MENARD, L. P. e DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit Rev Microbiol**, v.28, n.1, p.43-60, 2002.
- MERSON, M. H., ORSKOV, F., ORSKOV, I., SACK, R. B., HUQ, I. e KOSTER, F. T. Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.23, n.2, Feb, p.325-9, 1979.
- MICROBIONET. **The serotypes of Vero toxin-producing *Escherichia coli* reported in the literature, apart from those belonging to serogroup O157**. Disponível em:<www.microbionet.com.au/vtetable.htm> Acesso em:15 jan 2008.
- MILLER, V. L., KAPER, J. B., PORTNOY, D. A. e ISBERG, R. R. **Molecular genetics of bacterial pathogenesis**. Washington: ASM Press, 1994. 529 p.
- MOON, J. Y., PARK, J. H. e KIM, Y. B. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v.253, n.2, Dec 15, p.215-20, 2005.

MOYO, S. J., MASELLE, S. Y., MATEE, M. I., LANGELAND, N. e MYLVAGANAM, H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. **BMC Infect Dis**, v.7, p.92, 2007.

NAKAO, H., KIMURA, K., MURAKAMI, H., MARUYAMA, T. e TAKEDA, T. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Japan. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.34, p.289-297, 2002.

NATARO, J. K., BOPP, C. A., FIELDS, P. I., KAPER, J. B. e STROCKBINE, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: MURRAY, P. R., *et al* (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington D.C.: ASM Press, v.1, 2007. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*, p.670-687

NATARO, J. P. e KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v.11, n.1, Jan, p.142-201, 1998.

NATARO, J. P., MAI, V., JOHNSON, J., BLACKWELDER, W. C., HEIMER, R., TIRREL, S., EDBERG, S. C., BRADEN, C. R., MORRIS, J. G. e HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clin Infect Dis**, v.43, p.402-407, 2006.

NATARO, J. P., STEINER, T. e GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v.4, n.2, Apr-Jun, p.251-61, 1998.

NATARO, J. P., YIKANG, D., YINGKANG, D. e WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v.176, n.15, Aug, p.4691-9, 1994.

NOWICKI, B., LABIGNE, A., MOSELEY, S., HULL, R., HULL, S. e MOULDS, J. 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. **Infect Immun**, v.58, n.1, Jan, p.279-81, 1990.

OLSVIK, O. e STROCKBINE, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**, p.271-6, 1993.

ORLANDI, P. P., MAGALHAES, G. F., MATOS, N. B., SILVA, T., PENATTI, M., NOGUEIRA, P. A. e SILVA, L. H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz J Med Biol Res**, v.39, n.4, Apr, p.507-17, 2006.

PATON, A. W., BEUTIN, L. e PATON, J. C. Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. **Gene**, v.153, p.71-74, 1995.

PATON, A. W. e PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. **J Clin Microbiol**, v.36, n.2, Feb, p.598-602, 1998.

_____. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. **J Clin Microbiol**, v.40, n.1, Jan, p.271-4, 2002.

_____. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. **J Clin Microbiol**, v.43, n.6, Jun, p.2944-7, 2005.

PATON, A. W., PATON, J. C., GOLDWATER, P. N. e MANNING, P. A. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.31, n.11, Nov, p.3063-7, 1993.

PATON, A. W., RATCLIFF, R. M., DOYLE, R. M., SEYMOUR-MURRAY, J., DAVOS, D., LANSER, J. A. e PATON, J. C. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v.34, n.7, Jul, p.1622-7, 1996.

PATON, A. W., SRIMANOTE, P., TALBOT, U. M., WANG, H. e PATON, J. C. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. **J Exp Med**, v.200, n.1, Jul 5, p.35-46, 2004.

PATON, A. W., SRIMANOTE, P., WOODROW, M. C. e PATON, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect Immun**, v.69, n.11, Nov, p.6999-7009, 2001.

PATON, A. W., WOODROW, M. C., DOYLE, R. M., LANSER, J. A. e PATON, J. C. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **J Clin Microbiol**, v.37, n.10, Oct, p.3357-61, 1999.

PATON, J. C. e PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin Microbiol Rev**, v.11, n.3, Jul, p.450-79, 1998.

PERSING, D. H., SMITH, T. F., TENOVER, F. C. e T.J., W. **Diagnostic Molecular Microbiology**. Washington: : ASM 1993

PERSSON, S., OLSEN, K. E., SCHEUTZ, F., KROGFELT, K. A. e GERNER-SMIDT, P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. **Clin Microbiol Infect**, v.13, n.5, May, p.516-24, 2007.

PETERSON, J. W. e WHIPP, S. C. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.63, n.4, Apr, p.1452-61, 1995.

QADRI, F., SVENNERHOLM, A. M., FARUQUE, A. S. e SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin Microbiol Rev**, v.18, n.3, Jul, p.465-83, 2005.

RATCHTRACHENCHAI, O. A., SUBPASU, S., HAYASHI, H. e BA-THEIN, W. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. **J Med Microbiol**, v.53, n.Pt 3, Mar, p.237-43, 2004.

REGUA-MANGIA, A. H., GOMES, T. A., VIEIRA, M. A., ANDRADE, J. R., IRINO, K. e TEIXEIRA, L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J Infect**, v.48, n.2, Feb, p.161-7, 2004.

RILEY, L. W., REMIS, R. S., HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B., WELLS, J. G., DAVIS, B. R., HEBERT, R. J., OLCOTT, E. S., JOHNSON, L. M., HARGRETT, N. T., BLAKE, P. A. e COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N Engl J Med**, v.308, n.12, Mar 24, p.681-5, 1983.

ROBINS-BROWNE, R. M., BORDUN, A., TAUSCHEK, M., BENNETT-WOOD, V. R., RUSSELL, J., OPPEDISANO, F., LISTER, N. A., BETTELHEIM, K. A., FAIRLEY, C. K., SINCLAIR, M. I. e HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect.**, v.10, n.10, p.1797-1805, 2004.

SALYERS, A. A. e WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis. A molecular approach.** . Washington D.C.: ASM Press, 2002. 539 p.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. **Molecular cloning - a laboratory manual.** New York: CSH, 1989

SANGER, F., NICKLEN, S. e COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.74, n.12, Dec, p.5463-7, 1977.

SAVARINO, S. J., FASANO, A., ROBERTSON, D. C. e LEVINE, M. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J Clin Invest**, v.87, n.4, Apr, p.1450-5, 1991.

SAVARINO, S. J., FASANO, A., WATSON, J., MARTIN, B. M., LEVINE, M. M., GUANDALINI, S. e GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.7, Apr 1, p.3093-7, 1993.

- SAVARINO, S. J., MCVEIGH, A., WATSON, J., CRAVIOTO, A., MOLINA, J., ECHEVERRIA, P., BHAN, M. K., LEVINE, M. M. e FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative E. coli. **J Infect Dis**, v.173, n.4, Apr, p.1019-22, 1996.
- SCALETSKY, I. C., FABBRICOTTI, S. H., CARVALHO, R. L., NUNES, C. R., MARANHÃO, H. S., MORAIS, M. B. e FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **J Clin Microbiol**, v.40, n.2, Feb, p.645-8, 2002.
- SCALETSKY, I. C., SILVA, M. L. e TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect Immun**, v.45, n.2, Aug, p.534-6, 1984.
- SCHMIDT, H., BEUTIN, L. e KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infect Immun**, v.63, n.3, Mar, p.1055-61, 1995.
- SCHMIDT, H., KNOP, C., FRANKE, S., ALEKSIC, S., HEESEMANN, J. e KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v.33, n.3, Mar, p.701-5, 1995.
- SEARS, C. L. e KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol Rev**, v.60, n.1, Mar, p.167-215, 1996.
- SHERLOCK, O., VEJBORG, R. M. e KLEMM, P. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. **Infect Immun**, v.73, n.4, Apr, p.1954-63, 2005.
- SIEGLER, R. L., OBRIG, T. G., PYSHER, T. J., TESH, V. L., DENKERS, N. D. e TAYLOR, F. B. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. **Pediatr Nephrol**, v.18, n.2, Feb, p.92-6, 2003.
- SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. 246, 258-259 p.
- SIXMA, T. K., KALK, K. H., VAN ZANTEN, B. A., DAUTER, Z., KINGMA, J., WITHOLT, B. e HOL, W. G. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **J Mol Biol**, v.230, n.3, Apr 5, p.890-918, 1993.
- STEINER, T. S., NATARO, J. P., POTEET-SMITH, C. E., SMITH, J. A. e GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J Clin Invest**, v.105, n.12, Jun, p.1769-77, 2000.

STEPHAN, R. e HOELZLE, L. E. Characterization of shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP. **Lett Appl Microbiol**, v.31, n.2, Aug, p.139-42, 2000.

SWERDLOW, D. L. e GRIFFIN, P. M. Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. **Lancet**, v.349, n.9054, Mar 15, p.745-6, 1997.

TARR, P. I., GORDON, C. A. e CHANDLER, W. L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **Lancet**, v.365, p.1073-1086, 2005.

TELEN, M. J., HALL, S. E., GREEN, A. M., MOULDS, J. J. e ROSSE, W. F. Identification of human erythrocyte blood group antigens on decay-accelerating factor (DAF) and an erythrocyte phenotype negative for DAF. **J Exp Med**, v.167, n.6, Jun 1, p.1993-8, 1988.

TOMA, C., LU, Y., HIGA, N., NAKASONE, N., CHINEN, I., BASCHKIER, A., RIVAS, M. e IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v.41, n.6, Jun, p.2669-71, 2003.

TRABULSI, L. R., KELLER, R. e TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v.8, n.5, May, p.508-13, 2002.

TURNER, S. M., SCOTT-TUCKER, A., COOPER, L. M. e HENDERSON, I. R. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v.263, n.1, Oct, p.10-20, 2006.

UBER, A. P., TRABULSI, L. R., IRINO, K., BEUTIN, L., GHILARDI, A. C., GOMES, T. A., LIBERATORE, A. M., DE CASTRO, A. F. e ELIAS, W. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiol Lett**, v.256, n.2, Mar, p.251-7, 2006.

VAANDRAGER, A. B. Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. **Mol Cell Biochem**, v.230, n.1-2, Jan, p.73-83, 2002.

VAZ, T. M., IRINO, K., KATO, M. A., DIAS, A. M., GOMES, T. A., MEDEIROS, M. I., ROCHA, M. M. e GUTH, B. E. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J Clin Microbiol**, v.42, n.2, Feb, p.903-5, 2004.

WANKE, C. A. To know *Escherichia coli* is to know bacterial diarrheal disease. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, p.1710-1712, 2001.

WATTERWORTH, L., TOPP, E., SCHRAFT, H. e LEUNG, K. T. Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. **J Microbiol Methods**, v.60, n.1, Jan, p.93-105, 2005.

WHO. New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections. Part I. **Wkly Epidemiol Rec**, v.74, n.13, Apr 2, p.98-101, 1999.

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v.10, n.4, Oct, p.569-84, 1997.

YANG, J. R., WU, F. T., TSAI, J. L., MU, J. J., LIN, L. F., CHEN, K. L., KUO, S. H., CHIANG, C. S. e WU, H. S. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. **J Clin Microbiol**, v.45, n.11, Nov, p.3620-5, 2007.

ZHANG, W. L.; KÖHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SUERBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol**, v.40, n.12, Dec, p.4486-4492, 2002.

ZHANG, W., BIELASZEWSKA, M., KUCZIUS, T. e KARCH, H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. **J Clin Microbiol**, v.40, n.4, Apr, p.1441-6, 2002.

ANEXO

Aprovação do comitê de ética