

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA EMANOELLI ARAÚJO DE ASSIS

**PREVALÊNCIA E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS  
ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS  
ISOLADAS NO PARANÁ**

Curitiba  
2012

FLÁVIA EMANOELLI ARAÚJO DE ASSIS

**PREVALÊNCIA E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS  
ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS  
ISOLADAS NO PARANÁ**

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 M. T.  
Fadel Picheth

Curitiba  
2012

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me guardar e por iluminar o meu caminho, colocando ao meu lado pessoas especiais, que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente.

Agradeço à minha mãe Marlene pelo amor, carinho, paciência e por sempre estar presente e torcendo por minhas conquistas. Ao meu pai Josafá por me ensinar os verdadeiros valores da vida e pelos ensinamentos de coragem e humildade. Agradeço aos meus irmãos Mileny e Denys, pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado, compartilhando dos meus sonhos.

Agradeço também a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Especialmente a minha orientadora Profa Dra Cyntia Maria Telles Fadel-Pichet quero agradecer por tudo o que fez por mim, para a realização deste trabalho, pelos conhecimentos compartilhados e principalmente pela confiança depositada.

Agradeço ao Laboratório Central do Estado do Paraná-LACEN, e ao Laboratório Municipal de Curitiba pelo fornecimento das amostras sem as quais este trabalho não seria possível.

À Sônia Farah, do Laboratório de Bacteriologia geral do LACEN/PR, agradeço por compartilhar suas experiências e pela grande contribuição neste trabalho.

À Fabiana De Toni agradeço por toda a ajuda, e contribuição para que este trabalho fosse realizado.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Clínica: Ana Carolina, Fagna, Carolzinha, Cristina, Cibelle, Marina, Mônica, Suelen e Fernando pelos momentos de descontração, por compartilharem conhecimentos e pelo auxílio no dia-a-dia.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Suelen Wolf, pelo companheirismo, amizade e pelas sugestões contrutivas neste trabalho.

Agradeço à CAPES-REUNI pela bolsa concedida durante o curso.

*“Debaixo do sol, não é dos ligeiros a carreira,  
nem dos valentes a peleja, nem tão pouco dos  
sábios o pão, nem ainda dos prudentes a riqueza,  
nem dos entendidos o favor, mas o tempo e  
a sorte pertencem a todos”*

*(Eclesiastes, 9:11)*

## RESUMO

As doenças diarreicas são um grave problema de saúde pública e permanecem como uma das principais causas de mortalidade infantil. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência de estirpes diarreogênicas de *E.coli* (DEC), *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp, *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides* em amostras de fezes diarreicas de adultos e crianças no estado do Paraná. Foram utilizados métodos microbiológicos convencionais para a cultura e identificação desses patógenos e a reação em cadeia da polimerase para vários genes alvo (PCR multiplex) para a detecção, isolamento e caracterização das estirpes DEC. A determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das bactérias isoladas foi feita utilizando E-test para *Campylobacter* e disco-difusão para as demais. Um total de 400 amostras fecais foi analisado, sendo 305 provenientes do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR) e 95 do Laboratório Municipal de Curitiba (LMC). No total, o índice de positividade foi de 20,7%. Os patógenos isolados e as respectivas frequências são: *Salmonella* spp (9,2%), *Aeromonas* spp (6,5%), estirpes de *E. coli* diarreogênicas (5,2%) e *Campylobacter* (1%). Não foram detectados casos de diarreia associados com *Shigella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp, *P. shigelloides*, EIEC e ETEC. Exceto para *Salmonella* spp, para a qual foi observada uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0066$ ) quanto a frequência nas amostras do LACEN (11,5%) e do LMC (2,1%), não houve diferença significativa nas frequências dos outros enteropatógenos isolados nas amostras dos dois laboratórios. A frequência de *Salmonella* em crianças de 0 - 5 anos foi significativamente menor ( $p=0,022$ ) que nas demais faixas etárias. Nas amostras provenientes do LACEN *Salmonella* spp foi a bactéria isolada com maior frequência (11,5%) e *Aeromonas* (11,6%) nas amostras do LMC, sendo *A. caviae* (8,4%) a espécie predominante. As *E. coli* diarreogênicas contribuíram com uma parcela significativa (5,2%) dos casos de diarreia sendo aEPEC (3,2%) o principal patótipo isolado. *C. jejuni* foi isolado em frequência de 1%. Resistência a um ou mais antimicrobianos foi detectada em todos os grupos de patógenos isolados neste estudo. A resistência mais comum entre as estirpes de *Salmonella* foi ao ácido nalidíxico (83,8%) seguido por cloranfenicol, ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim (10,8%). Entre as estirpes de *Aeromonas* a resistência mais comum foi à ampicilina (96,1%, resistência intrínseca) como esperado, seguida por amoxicilina/ácido clavulânico (26,9%). Entre as estirpes de DEC, 47% foram sensíveis à todos os antimicrobianos testados, sendo a resistência à ampicilina (52,4%) a mais comum entre essas bactérias. Entre as estirpes de *C. jejuni*, resistência à ciprofloxacina foi observada em 75% dos isolados, e à tetraciclina em 25%, sendo todas as estirpes sensíveis à eritromicina. Os resultados deste trabalho mostram que *Salmonella*, *Aeromonas* e as *E. coli* diarreogênicas são as principais causas de diarreia de origem bacteriana no Paraná. Entretanto *Aeromonas* e DEC não fazem parte dos patógenos pesquisados na coprocultura nos laboratórios clínicos. A frequência encontrada para estes patógenos no Paraná justifica que sejam incluídos nas análises de rotina nas coproculturas.

Palavras-chave: Diarreia, *Aeromonas*, *Escherichia coli* diarreogênica, *Salmonella*, *Campylobacter*.

## ABSTRACT

Diarrheal diseases are a serious public health problem and remain a major cause of infant mortality. The aim of this study was to determine the frequency of diarrheogenic *E. coli* (DEC), *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp and *Plesiomonas shigelloides* in samples of diarrheal stools of adults and children in the state of Paraná. Conventional microbiological methods were used for culture and identification of pathogens, and polymerase chain reaction to various target genes (multiplex PCR) for the detection, isolation and characterization of the DEC strains. The antimicrobial susceptibility profile of the isolates was determined using test for *Campylobacter* and disk diffusion for other bacteria. A total of 400 stools samples were analyzed, being 305 from the Central Laboratory of Paraná State (LACEN / PR) and 95 from the Municipal Laboratory of Curitiba (LMC). Overall the frequency of positive tests was 20.7%. The pathogens found and respective frequencies are: *Salmonella* (9.2%), *Aeromonas* (6.5%), diarrheogenic *E. coli* (5.2%) and *Campylobacter* (1%). There were no detected cases of diarrhea associated with *Shigella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp, *P. shigelloides* EIEC and ETEC. Except for *Salmonella* spp, for which a statistically significant difference was found ( $p = 0.0066$ ) between the frequencies found in samples from LACEN (11.5%) and LMC (2.1%), no significant difference was found in the frequencies of the other enteropathogens isolated from samples of these laboratories. *Salmonella* frequency among children 0-5 years older was significantly lower ( $p=0,022$ ) than in the other age groups. In samples from LACEN *Salmonella* were the most frequent pathogen isolated (11.5%) and *Aeromonas* (11.6%) in samples of the LMC, being *A. caviae* (8.4%) the predominant species. The diarrheogenic *E. coli* were responsible for a significant proportion (5.2%) of diarrhea cases and aEPEC (3.2%) was the major pathotype of DEC isolated. *C. jejuni* was isolated in frequency of 1%. Resistance to one or more antimicrobials was detected in all groups of pathogens isolated in this study. The most common resistance among *Salmonella* strains was to nalidixic acid (83.8%) followed by chloramphenicol, ampicillin and trimethoprim / sulfamethoxazole (10.8%). Among the *Aeromonas* strains resistance to ampicillin was the most common (96.1%, intrinsic resistance) as expected, followed by amoxicillin / clavulanate (26.9%). Among the strains of DEC 47% were sensitive to all antibiotics tested, and the ampicillin resistance (52.4%) was the most common among these bacteria. Among the *C. jejuni* strains, ciprofloxacin resistance was observed in 75% of the isolates, and tetracycline in 25%, all strains were sensitive to erythromycin. The results of these study show that *Salmonella*, *Aeromonas* and diarrheogenic *E. coli* are the major causes of bacterial diarrhea in Paraná State. However *Aeromonas* and DEC are not sought in the stool culture for enteropathogens in clinical laboratories. The frequency found for these pathogens in Paraná warrants its inclusion in the routine analysis.

Key-words: Diarrhea, *Aeromonas*, Diarrheogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – ETAPA DE ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS DE DEC ..... 44
- FIGURA 2** – ASPECTO DAS COLÔNIAS DE *Salmonella* spp e *Campylobacter* spp. EM ÁGAR SELETIVO. .... 47
- FIGURA 3** – PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS DAS *E.coli* DIARREOGÊNICAS E CONTROLES NEGATIVOS 49

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1**– FREQUÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS A PARTIR DE AMOSTRAS PROVENIENTES DO LACEN/PR.. 50
- GRÁFICO 2**– FREQUÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DO LMC ..... 51



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	– BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO CONTROLES DA PCR .....	41
<b>TABELA 2</b>	– INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS COM <i>E.coli</i> DIARREIOGÊNICAS.....	42
<b>TABELA 3</b>	– FREQUÊNCIA DOS ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS A PARTIR DE AMOSTRAS DO LACEN E LMC.....	52
<b>TABELA 4</b>	– DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES DOS QUAIIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LACEN/PR (CONTINUA)..	53
<b>TABELA 5</b>	– DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS PESSOAS DAS QUAIIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LMC (CONTINUA).....	58
<b>TABELA 6</b>	– COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ENTEROPATÓGENOS POR GRUPO DE FAIXAS ETÁRIAS..	63
<b>TABELA 7</b>	– PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> (CONTINUA) .....	64
<b>TABELA 8</b>	– PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE <i>SALMONELLA</i> (CONTINUA) .....	66
<b>TABELA 9</b>	– PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE <i>E.coli</i> DIARREOGÊNICAS (CONTINUA) .....	70
<b>TABELA 10</b>	– PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE <i>CAMPYLOBACTER</i> .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	– Aderência agregativa
A/E	– Lesão do tipo <i>attaching and effacing</i>
AAF	– Fímbria de aderência agregativa
AAF/I	– Fímbria de aderência agregativa I
AAF/II	– Fímbria de aderência agregativa II
aEPEC	– <i>E.coli</i> Enteropatogênica atípica
AfaE-I	– Adesina não fimbrial I
AfaE-II	– Adesina não fimbrial II
AggR	– Ativador transcricional de genes de virulência de EAEC
APA	– Água Peptonada Alcalina
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
BFP	– <i>Bundle-forming pilus</i>
cAMP	– Adenosina monofosfato cíclico
CFA	– Antígeno de fator de colonização
cGMP	– Guanosina monofosfato cíclico
CHO	– Células de Ovário de Hamster Chinês
CT	– Toxina colérica
pCVD432	– Plasmídio de aderência agregativa
DA	– Aderência difusa
DAEC	– <i>Escherichia coli</i> de aderência Difusa
DAF	– <i>Decay-acceleration factor</i>
DEC	– <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
dNTP	– Desoxiribonucleotídeo Trifosfatado
EAEC	– <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EAST 1	– Toxina termo-estável de <i>E. coli</i> enteroagregativa1
EAF	– Fator de aderência da EPEC

EIEC	– <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora
EHEC	– <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EPEC	– <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ETEC	– <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
HeLa	– Células de carcinoma de útero humano
HEp-2	– Células de carcinoma cervical humano
KIA	– <i>Kligler Iron Agar</i>
LA	– Aderência localizada
LACEN	– Laboratório Central do Estado
LAL	– Adesão LA-like
LEE	– <i>Locus of enterocyte effacement</i>
LIA	– Ágar lisina ferro
LMC	– Laboratório Municipal de Curitiba
LT	– Toxina termolábil
MC	– Ágar MacConkey
MILi	– Ágar motilidade, indol e lisina
O/129	– 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina (agente vibriostático)
pAA	– Plasmídio de aderência agregativa
pb	– Pares de Bases
PCF	– Provável fator de colonização
PCR	– <i>Polymerase chain reaction</i>
pmol	– Picomol
pInv	– Plasmídio de virulência de EIEC/ <i>Shigella</i>
SS	– Ágar Salmonella-Shigella
STEC	– <i>Escherichia coli</i> Produtora de Toxina Shiga
ST	– Toxina termoestável
Stx	– Toxina Shiga
Stx1	– Toxina Shiga 1
Stx2	– Toxina Shiga 2

tEPEC	– <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica
TCBS	– Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
TSA	– Ágar Triptona de Soja
TTSS	– Sistema de secreção do tipo III
V	– Volts
XLD	– Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC) .....	17
a) EPEC típica e EPEC atípica .....	18
2.1.3 <i>Escherichia coli</i> Produtora de Toxina Shiga (STEC) .....	19
2.1.4 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC) .....	20
2.1.5 <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora (EIEC) .....	22
2.1.6 <i>Escherichia coli</i> que Adere Difusamente (DAEC) .....	23
2.1.7 <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC) .....	24
2.2 DETECÇÃO LABORATORIAL DAS <i>E.coli</i> DIARREOGÊNICAS.....	26
2.3 <i>Salmonella</i> .....	27
2.4 <i>Shigella</i> .....	28
2.5 <i>Yersinia</i> .....	29
2.6 <i>Aeromonas</i> .....	31
2.7 <i>Plesiomonas shigelloides</i> .....	32
2.8 <i>Vibrio</i> .....	33
2.9 <i>Campylobacter</i> .....	35
2.10 DETECÇÃO LABORATORIAL DE <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> e <i>Campylobacter</i> .....	36
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1 AMOSTRA.....	39
4.2 METODOLOGIAS EMPREGADAS .....	39
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	39
4.3.1 Meios de cultura e condições utilizadas para a realização da coprocultura ....	39
4.3.2 Cultivo para a detecção de estirpes diarreogênicas de <i>E.coli</i> .....	40
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA .....	41
4.5 PCR .....	41
4.5.1 Bactérias utilizadas como controles de PCR.....	41
4.6 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	43
4.7 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS.....	44
4.7.1 Isolamento das <i>E.coli</i> diarreogênicas.....	44
4.7.2 Caracterização bioquímica das <i>E.coli</i> diarreogênicas .....	45
4.7.3 Isolamento e identificação bioquímica das <i>E.coli</i> diarreogênicas .....	45
a) <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> .....	45
b) <i>Vibrio</i> spp.....	46
c) <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	46
d) <i>Aeromonas</i> e <i>P. shigelloides</i> .....	46
e) <i>Campylobacter</i> .....	47
4.10 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	48
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	48
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>

5.1 PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE REFERÊNCIA DE <i>E.coli</i> DIARREIOGÊNICAS E CONTROLES NEGATIVOS NOS SISTEMAS DE PCR-MULTIPLEX .....	49
5.2 FREQUÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS .....	50
5.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	63
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>9 ANEXO .....</b>	<b>113</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Diarreia é a segunda principal causa de morte entre crianças menores de cinco anos em todo o mundo. Quase uma em cada cinco mortes de crianças é devida à diarreia, somando cerca de 1,5 milhões a cada ano (UNICEF/WHO, 2009). Em países em desenvolvimento, crianças podem apresentar vários episódios de diarreia aguda por ano. Cada um deles contribui para o ciclo de desnutrição-infecção e comprometimento do crescimento e desenvolvimento dessas crianças (KOSEK, BERN e GUERRANT, 2003).

Os agentes bacterianos causadores de diarreia mais comuns são as estirpes diarreogênicas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter jejuni* (ORLANDI *et al.*, 2006; YONGSY *et al.*, 2008; LOUREIRO *et al.*, 2010). As *E. coli* diarreogênicas (DEC) são atualmente classificadas em 7 categorias: *E. coli* enteropatogênica (típica – tEPEC, atípica - aEPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998; SCHMIDT, 2010). O diagnóstico das DEC não pode ser realizado utilizando métodos microbiológicos convencionais isoladamente uma vez que essas bactérias são indistinguíveis bioquimicamente das demais *E. coli* não patogênicas normalmente presentes na microbiota intestinal. A diferenciação das DEC requer a utilização de métodos moleculares, imunológicos e/ou cultivo celular (NATARO *et al.*, 1998). Os avanços nas técnicas de diagnóstico têm aumentado a capacidade de detecção destes patógenos (NGUYEN *et al.*, 2005).

Além desses, vários outros patógenos bacterianos também são capazes de causar diarreia, mas, no entanto, parecem ser menos frequentes (JANDA E ABBOTT 2011).

Neste trabalho a presença de estirpes de DEC, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* foi investigada, em amostras fecais de pessoas com diarreia, utilizando métodos microbiológicos convencionais, e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção dos patótipos diarreogênicos de *E. coli*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As doenças diarreicas são um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e permanecem como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (DOSSO, COULIBALY e KADIO, 1998; WANKE, 2001; KOSEK, BERN e GUERRANT, 2003; WHO/UNICEF, 2009). Estima-se que ocorram cerca de 2,5 bilhões de casos de diarreia por ano em todo o mundo e aproximadamente 20% das mortes de crianças de 0-5 anos são relacionadas à diarreia (BOSHI-PINTO, VELEBIT e SHIBUYA, 2008; WHO/UNICEF, 2009).

Os estudos epidemiológicos revelam que os agentes bacterianos mais comumente associados com diarreia são as linhagens diarreogênicas de *Escherichia coli*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp e *Campylobacter jejuni* (ORLANDI *et al.*, 2006; YONGSY *et al.*, 2008; LOUREIRO *et al.*, 2010). Além disso, outros microrganismos também são capazes de causar diarreia incluindo bactérias como *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas shigelloides* e *Y. enterocolitica*, protozoários como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp, *Entamoeba* e vírus como o *Rotavírus* entre outros (LANATA e MENDOZA, 2002; DIEMERT, 2006; FALCAO *et al.*, 2007; GHENGHESH *et al.*, 2008; EL QOUGA *et al.*, 2011).

### 2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é a bactéria anaeróbia facultativa encontrada em maior número na microbiota intestinal (NATARO e KAPER, 1998). Este organismo faz parte da família *Enterobacteriaceae*, composta por bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos e fermentadores de glucose. Desenvolve-se bem em meios de cultura utilizados na rotina laboratorial como MacConkey e Teague (NATARO *et al.*, 2007).

*E.coli* normalmente coloniza o trato gastrointestinal infantil dentro das primeiras horas de vida e posteriormente desenvolve uma relação de benefício mútuo com o hospedeiro. Esta bactéria comensal raramente causa doença, no entanto em pacientes debilitados, imunossuprimidos ou quando as barreiras



gastrointestinais são violadas, até mesmo as estirpes de *E. coli* não patogênicas podem causar infecção (NATARO e KAPER, 1998).

No entanto, existem vários clones de *E. coli* que adquiriram fatores específicos de virulência e desenvolveram a capacidade de causar um amplo espectro de doenças em humanos e até mesmo indivíduos saudáveis podem ser susceptíveis à infecção por esses agentes (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; WILLIAMS, TORRES e LLOYD, 2010). As estirpes patogênicas de *E. coli* causam basicamente três síndromes clínicas: infecção do trato urinário, sepse/ meningite e diarreia (NATARO e KAPER, 1998; HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2005).

As estirpes de *E. coli* que causam diarreia humana podem ser divididas em sete grupos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica também conhecida como produtora de toxina Vero ou Shiga (EHEC, VTEC ou STEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica típica (tEPEC), *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Cada um desses patotipos tem características distintivas relacionados com a epidemiologia, patogênese, manifestações clínicas e tratamento (HUANG *et al.*, 2006).

A identificação de estirpes diarreio gênicas de *E. coli* exige a diferenciação dos membros não patogênicos que compõem a microbiota intestinal (NATARO e KAPER, 1998). Na rotina dos laboratórios a sorotipagem tem sido utilizada, entretanto essa metodologia requer grande número de anti-soros além de ser um marcador insuficiente para identificar com segurança uma estirpe diarreica uma vez que os antígenos de superfície não têm relação direta com virulência (SALYERS e WHITT, 2002; YANG *et al.*, 2007)

A utilização da sorologia isoladamente para diferenciar estirpes de *E. coli* patogênicas pode levar a resultados falso-positivos, uma vez que a confiabilidade da sorotipagem é limitada a certas estirpes ou sorogrupos (YANG *et al.*, 2007). Assim, a identificação destas estirpes patogênicas centrou-se cada vez mais na identificação de características que determinam a virulência dessas bactérias, ou dos genes que as codificam e que sirvam como marcadores moleculares (RODRÍGUES-ANGELEZ, 2002). A diferenciação desses patotipos pode requerer ensaios de adesão em células HEp-2 ou HeLa, testes de citotoxicidade, ensaios imunológicos, ensaios de

hibridização de DNA e/ou PCR para detectar a presença de genes que codificam essas características (NATARO e KAPER, 1998; PIAZZA *et al.*, 2010).

Atualmente métodos moleculares tais como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e outros ensaios moleculares têm sido extensivamente utilizados para detectar *E. coli* envolvidas em infecções gastrointestinais (NATARO e KAPER, 1998). A PCR representa um grande avanço no diagnóstico molecular de microrganismos patogênicos, e uma das vantagens é possuir uma grande sensibilidade na detecção do DNA alvo (STACY-PHIPPS, 1995).

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

### 2.1.2 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

*Escherichia coli* enteropatogênica foi o primeiro patotipo de *E.coli* a ser descrito, identificado sorologicamente e associado com casos de diarreia em crianças, sendo a aderência um dos seus principais fatores de patogenicidade (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002).

Os principais sintomas clínicos da infecção causada por EPEC são diarreia aquosa acompanhada de febre, mal-estar e vômitos. Essas bactérias causam doença primariamente em crianças menores de 2 anos de idade. A provável explicação para a razão da resistência relativa de adultos e crianças mais velhas é a perda de receptores específicos com a idade (NATARO e KAPER, 1998).

As estirpes de EPEC produzem um padrão de aderência característico, denominado de aderência localizada, em células Hep-2 ou HeLa (SCALETISKY, SILVA e TRABULSI, 1984; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Neste modelo, as bactérias se ligam a áreas localizadas na superfície celular, formando microcolônias compactas (*clusters* bacterianos) que podem ser visualizadas 3 horas após o contato das bactérias com as células. Esse fenômeno está associado à presença do plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*) (NATARO e KAPER, 1998).

O principal fator responsável pela aderência localizada é um tipo de *pilus* denominado *bundle-forming pilus* (BFP), codificado pelo gene *bfp* presente no plasmídeo EAF, que interconecta as bactérias formando as microcolônias no epitélio do intestino delgado e promove a sua estabilização (NATARO e KAPER, 1998).

O principal mecanismo da patogênese da EPEC é a lesão *attaching and effacing* (A/E). Esta é caracterizada pela aderência íntima da bactéria à superfície das células epiteliais, seguida de destruição das microvilosidades, formação de pedestal e agregação polarizada de moléculas de  $\alpha$ -actina, bem como de outros componentes do citoesqueleto situados abaixo do sítio de adesão, devido ao aumento dos níveis de cálcio intracelular e de proteína quinase C (DONNENBERG e KAPER, 1992; NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

O desenvolvimento 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). LEE é uma ilha de patogenicidade que contém vários genes associados com virulência tais como genes que codificam a intimina, sistema de secreção do tipo III (necessário para transportar proteínas envolvidas na formação da lesão do tipo A/E), proteínas secretadas (Esp), e o receptor de translocação da intimina (Tir) (NATARO e KAPER, 1998; FRANKEL *et al.*, 1998; DONNENBERG e WHITTAM, 2001; SCHMIDT e HENSEL, 2004).

Um dos genes essenciais para a produção das lesões A/E é o *eae* que codifica a intimina, uma proteína necessária para a adesão íntima da bactéria à célula hospedeira e o desenvolvimento da lesão (ADU-BOBIE *et al.*, 1998).

#### a) EPEC típica e EPEC atípica

Em 1995 as EPECs foram divididas em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC). As estirpes de EPEC são consideradas típicas quando possuem os genes *eae* (LEE) e *bfp* (plasmídeo de virulência EAF). As EPECs atípicas possuem o gene *eae*, mas não o *bfp* (NATARO e KAPER, 1998; TRABULSI, KELLER e GOMES 2002; KAPER NATARO e MOBLEY, 2004; SCHMIDT 2010).

O plasmídeo EAF não é essencial para a formação das lesões do tipo A/E. Sabe-se que a sua presença aumenta a eficiência, provavelmente, através da influência de um *cluster* de genes reguladores que aumentam a expressão dos genes cromossomais da LEE. Além disso, evidências também indicam que o BFP desempenha um papel na adesão à célula hospedeira aumentando a eficiência da formação da lesão do tipo A/E (FRANKEL *et al.*, 1998; TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002; CLEARY *et al.*, 2004).

As EPECs típicas correspondem aos sorotipos clássicos de EPEC, como O55:NM, O55:H6 e O111:NM, e são importantes causas de diarreia em países em desenvolvimento, sendo mais raras em países industrializados onde ocorre prevalência das aEPEC (TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002). Estudos mostram que as aEPEC estão associadas com diarreias agudas prolongadas que podem durar em média de 14 dias (AFSET *et al.*, 2004; ESTRADA-GARCIA *et al.*, 2009).

As estirpes de tEPEC e aEPEC também diferem no padrão de aderência. Enquanto as tEPECs mostram somente o padrão de aderência localizada (LA), as aEPECs podem apresentar padrão de aderência denominado LA-like (LAL), caracterizado por microcolônias menos compactas e menos densas que as LA, padrão de aderência difusa (DA), ou o padrão de aderência agregativa (AA) (SKALETSKY *et al.*, 1999; DULGUER *et al.*, 2003; CAMPOS, FRANZOLIN e TRABULSI, 2004; TENNANT *et al.*, 2009; SKALETSKY *et al.*, 2010).

### 2.1.3 *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga (STEC)

*E.coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) foram reconhecidas em 1982 quando foram isoladas de pessoas envolvidas em surtos de diarreia sanguinolenta associada com a ingestão de hambúrgueres mal cozidos em fast foods e também de casos esporádicos de síndrome urêmica hemolítica (RILEY *et al.*, 1983; KARMALI *et al.*, 1983). Foi mostrado que essas bactérias provocavam um efeito citopático irreversível sobre cultura de células Vero e HeLa (KARMALI *et al.*, 1983; O'BRIEN *et al.*, 1983) e que esta citotoxicidade poderia ser neutralizada com antitoxina preparada contra a toxina de *Shigella dysenteriae* 1 (O'BRIEN *et al.*, 1983; NATARO e KAPER, 1998).

As STEC são caracterizadas pela produção de uma potente toxina denominada toxina Shiga (PATON e PATON, 1998). Esta toxina é o principal fator de virulência dessas bactérias que podem provocar desde diarreia não complicada a complicações graves como colite hemorrágica, púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) e síndrome urêmica hemolítica (SUH) podendo até mesmo levar à morte (KARMALI, 1989; NATARO e KAPER, 1998; O'BRIEN *et al.*, 1987; TZIPORI *et al.*, 2004).

Existem dois tipos principais dessas toxinas, que são denominadas toxina Shiga1 (Stx1) e toxina Shiga 2 (Stx2). Elas apresentam 55% de homologia e são codificadas pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente (NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). 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, enquanto que Stx2 apresenta 56% de similaridade na seqüência de aminoácidos com as duas outras toxinas (JACKSON *et al.*, 1987; NATARO e KAPER, 1998; PATON, e PATON,1998). Além das toxinas Stx1 e Stx2 as STEC podem apresentar outros fatores de virulência que estão distribuídos de forma heterogênea entre as diferentes estirpes, e que aumentam sua virulência (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004), dentre eles a intimina, também presente nas EPEC e aEPEC (NATARO e KAPER, 1998). Esses subgrupos de STEC que contém *eae* são capazes de causar lesões *attaching and effacing* (A/E) e são denominados *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (NATARO e KAPER, 1998).

Atualmente além da STEC sorotipo O157:H7, identificada no surto em 1982, são reconhecidos mais de 200 sorotipos diferentes, designadas como STEC não-O157, capazes de causar doenças em humanos (PATON e PATON, 1998).

#### 2.1.4 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

As ETEC são uma importante causa de diarreia nos países em desenvolvimento, e são a principal causa da “diarreia do viajante” (NATARO *et al.*, 2007; SAHAH, DuPONT e RAMSEY, 2009; JIANG, *et al.*, 2010). As ETEC são mais difíceis de serem reconhecidas e por tanto, muitas vezes não são valorizadas como sendo a principal causa de diarreia em crianças (QADRI *et al.*, 2005).

Estas bactérias 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).

A transmissão de *E. coli* enterotoxigênica se dá pela ingestão de água e alimentos contaminados (NATARO e KAPER, 1998; QUADRI *et al.*, 2005).

As ETEC são caracterizadas pela produção de toxinas: a toxina-termolábil (LT) e a toxina termo-estável (ST). Uma ou ambas as toxinas podem ser expressas (SPANGLER, 1992). Este microrganismo coloniza a mucosa do intestino delgado e elabora suas enterotoxinas que dão origem a uma diarreia secretora semelhante à cólera. (SPANGLER, 1992; NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; QADRI *et al.*, 2005).

A toxina LT, codificada pelo gene plasmidial *lt*, é fisiologicamente, estruturalmente e antigenicamente similar à toxina da cólera (CT) expressa pelo *Vibrio cholerae*. Suas sequências de aminoácidos têm aproximadamente 80 % de similaridade e elas possuem o mesmo mecanismo de ação (SPANGLER, 1992; SEARS e KAPER, 1996; QUADRI *et al.*, 2005).

Existem dois grupos de toxinas LT: LT-I e LT-II, que não reagem cruzados em testes imunológicos. A LT-I é expressa em estirpes de ETEC que são patogênicas para humanos e animais e apresenta maior similaridade com a toxina da cólera. LT-II é encontrada principalmente em ETEC isoladas de animais e raramente em isolados de humanos (NATARO e KAPER, 1998).

Após a colonização do intestino delgado, as ETEC liberam a toxina LT, levando à ativação permanente da adenilato ciclase. Isto resulta em aumento de cAMP intracelular que estimula a secreção de cloreto e inibe a captação de NaCl. O desequilíbrio de íons resulta em diarreia aquosa pela perda de água (GILL e RICHARDSON, 1980; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

As toxinas ST são divididas em duas classes: STa (também chamada de ST-I) e STb, que diferem em estrutura e mecanismos de ação. As toxinas ST de ambas as classes são codificadas pelos genes *st* encontrados predominantemente em plasmídeos, e alguns em transposons (NATARO e KAPER, 1998; QUADRI *et al.*, 2005). Praticamente só as toxinas da classe STa estão associadas com doença em humanos (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

A toxina STa liberada no intestino delgado, se liga reversivelmente ao seu principal receptor de membrana, ativa guanilato ciclase, resultando em aumento dos níveis de cGMP. Altos níveis de cGMP ativa quinases cGMP dependentes,

umentando a secreção de cloreto e inibindo a absorção de NaCl, e dando origem a diarreia secretória (VAANDRAGER, 2002; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

A colonização do intestino é mediada por uma ou mais proteínas fimbriais ou fatores de colonização fibrilares (CFs) que são denominados CFA (antígenos de fator de colonização), CS (antígeno de superfície de coli) ou PCF (provável fator de colonização) seguidos por um número. Mais de 20 CFAs foram caracterizados e a maioria das ETEC isoladas de humanos expressa CFA/I, CFA/II ou CFA/IV (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; QUADRI *et al.*, 2005). Os genes das CFAs usualmente são codificados em plasmídeos, que também codificam as enterotoxinas ST e LT (NATARO e KAPER, 1998).

#### 2.1.5 *Escherichia coli* Enteroinvasora (EIEC)

EIEC são intimamente relacionadas à *Shigella* spp em seu perfil bioquímico, genético e patológico. Estudos genéticos mostram que *Shigella* e EIEC são taxonomicamente indistinguíveis ao nível de espécie, mas devido à importância do significado clínico da *Shigella* uma distinção na nomenclatura ainda é mantida (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; PARSOT, 2005). EIEC e *Shigella* são distinguidas por poucas provas bioquímicas, mas estes patógenos compartilham fatores de virulência essenciais (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

A patogênese da EIEC é semelhante a de *Shigella* e inicia-se com a invasão das células epiteliais do intestino, seguida pela lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, e disseminação da bactéria nos enterócitos, levando a destruição dos mesmos (NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; CROXEN e FINLAY, 2010).

Além da invasão e disseminação dentro das células epiteliais, que pode resultar em disenteria (fezes diarréicas com muco e sangue) EIEC e *Shigella* também produzem enterotoxinas secretoras que intensificam a diarreia (SANSONETTI, 2002). Quando a infecção é grave, a sequência desses eventos pode provocar uma forte reação inflamatória que se manifesta como ulcerações. Além disso, diarreia grave por *E. coli* Enteroinvasora pode evoluir para bacteremia em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (BESSESEN *et al.*, 1991; NATARO e KAPER, 1998).

Embora as infecções com estirpes de EIEC possam resultar em colite inflamatória invasiva e disenteria, na maioria das vezes essas estirpes causam diarreia aquosa (SEARS e KAPER, 1996).

A patogenicidade de EIEC e *Shigella* está em grande parte associada com a presença de um plasmídio de virulência denominado plnv, que contém os genes necessários para a invasão e disseminação bacteriana nas células do hospedeiro (NATARO e KAPER, 1998). Os genes *ipaH* (*invasion plasmid antigen*) e *ial* (*invasion associated locus*), associados com invasão, estão presentes no plasmídeo de virulência e são utilizados para o diagnóstico de EIEC. Entretanto *ipaH* também está presente no cromossomo de EIEC e *Shigella* (LUSCHER e ALTWEGG, 1994).

No plasmídio plnv estão presentes genes que codificam um sistema de secreção do tipo III (TTSS) que é essencial para a secreção de múltiplas proteínas necessárias para a patogenicidade entre elas as proteínas Ipa (IpaA, ipaB, ipaC e ipaD) codificadas nos *loci ipa*. Estas são proteínas efetoras no fenótipo da invasão e mediam eventos de sinalização celular, rearranjo do citoesqueleto, captação celular, lise do vacúolo fagocítico e induzem apoptose em macrófagos (NATARO e KAPER, 1998; ASHIDA *et al.*, 2007).

O TTSS é codificado pelos genes *mxi* e *spa*, e resulta na formação e inserção de um poro nas membranas da célula hospedeira através do qual são transportadas as proteínas efetoras (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

#### 2.1.6 *Escherichia coli* que adere Difusamente (DAEC)

O termo “*E.coli* que adere difusamente” foi inicialmente usado para se referir a qualquer estirpe de *E.coli* HEp-2 aderente que apresentava padrão de adesão distinto dos da EPEC (adesão localizada). Posteriormente a DAEC foi reconhecida como uma categoria independente de *E.coli* potencialmente patogênica (NATARO e KAPER, 1998).

Estes patotipos de *E. coli* são definidos pela presença de um padrão característico de adesão difusa às células HEp-2 bem como em células HeLa (SERVIN, 2005). Estudos mostram que DAEC está associada à diarreia sendo crianças maiores de 12 meses as mais afetadas (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; SERVIN, 2005; SPANO *et al.*, 2008).



O padrão de adesão difusa apresentado pelas DAEC é mediado por adesinas codificadas por uma família de operons, que expressam adesinas fimbriais (F1845 e Dr) e não fimbriais (AfaE-I e AfaE III) (LE BOUGUENEC, *et.al.*, 2006). A fímbria F1845 é codificada pelo gene *daaE* que pode estar presentes tanto no cromossomo bacteriano como em plasmídio (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; SERVIN, 2005). Aproximadamente 75% das estirpes de DAEC produzem a fímbria de adesão F1845. Esta fímbria pertence à família Dr de adesinas, que usam DAF (uma proteína de membrana, que normalmente protege células de danos pelo sistema complemento) como receptor.

As DAEC induzem um efeito citopático caracterizado pelo desenvolvimento de extensões celulares longas que envolvem a bactéria aderente efeito este, desencadeado pela ligação da F1845 ao receptor DAF (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). Além deste efeito, essas estirpes de *E. coli* 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 (BÉTIS *et al.*, 2003).

#### 2.1.7 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

EAEC foi reconhecida em 1987 ao ser isolada de uma criança chilena que apresentava diarreia persistente (NATARO *et al.*, 1987). Este grupo de DEC é uma causa comum da diarreia do viajante e foi identificado como a causa de vários surtos de diarreia entre adultos e crianças de países desenvolvidos e em desenvolvimento (OKEKE e NATARO, 2001; HUANG *et al.*, 2006; NAVARRO-GARCIA e ELIAS, 2011).

As EAEC são definidas pelo padrão de aderência agregativa (AA) às células HEp-2 caracterizado pela autoaglutinação proeminente entre as bactérias na superfície celular, o que é descrito como “tijolos empilhados” (NATARO e KAPER, 1998; OKEKE e NATARO, 2001; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

O plasmídeo de aderência agregativa (pAA), também chamado de CVD432, tem sido utilizado como marcador em estudos epidemiológicos e para a identificação da EAEC. Este plasmídio codifica vários genes de virulência tais como as fimbrias de aderência agregativa (AAF-I e II) (HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2005), a

toxina termo-estável de *E. coli* enteroagregativa 1 (EAST-1) (SAVARINO *et al.*, 1993), e o ativador transcricional AggR (NATARO *et al.*, 1994). Entretanto a distribuição destes fatores de virulência é bastante heterogênea (NATARO e KAPER, 1998).

A patogênese da EAEC inicia-se com colonização da mucosa intestinal, utilizando fímbrias de aderência agregativa (AAFs), seguida pela estimulação da secreção de muco na célula hospedeira, aprisionando as bactérias em um biofilme (que impede a absorção intestinal podendo provocar desnutrição principalmente em crianças), predominantemente no cólon, e por fim, a secreção de enterotoxinas e citotoxinas que desencadeiam uma resposta inflamatória, toxicidade e secreção intestinal (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998; WEINTRAUB, 2007; HUANG *et al.*, 2006).

O ativador transcricional AggR é regulador de um conjunto de genes de virulência da EAEC incluindo os que codificam fatores de aderência agregativa, fímbrias AAF / I e AAF / II (NATARO *et al.*, 1994), a proteína dispersina (VELARDE *et al.*, 2007) e um grande aglomerado de genes de uma ilha de patogenicidade inserida no *locus* PheU (HUANG *et al.*, 2006), e tem sido utilizado como marcador para este patotipo de *E. coli* (ARANDA *et al.*, 2004).

A enterotoxina termostável de *E. coli* enteroagregativa (EAST 1), codificada por um gene plasmidial (*astA*), foi a primeira toxina de EAEC a ser reconhecida e melhor caracterizada (SEARS e KAPER, 1996). Embora esta toxina tenha 50% de homologia com a STa de ETEC, elas são geneticamente e antigenicamente distintas. Acredita-se que a EAST1 contribui para a diarreia aquosa, no entanto, o gene da EAST1 também pode ser encontrado em muitos isolados de *E. coli* comensais e, conseqüentemente, o papel dessa toxina na patogênese da diarreia permanece controverso (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998; MENARD e DUBREUIL, 2002).

Como *E. coli* é ubiqüitária em fezes humanas e de animais, a presença dessa espécie na água é considerada um indicador de contaminação fecal. Essa bactéria pode ser isolada de água e alimentos contaminados com fezes, mas provavelmente não ocorre como organismo de vida livre no ambiente. *E. coli* é tipicamente transmitida através da ingestão de água e alimentos contaminados,

contato pessoa a pessoa, contato com animais e ambientes ou fômites contaminados com material fecal (NATARO *et al.*, 2011).

## 2.2 DETECÇÃO LABORATORIAL DAS *E.coli* DIARREIOGÊNICAS

EPEC e EIEC podem ser isoladas através de cultura em meios seletivos diferenciais, e detectadas através da aglutinação com anticorpos contra o antígeno somático para EPEC e EIEC (GRAY, 1995; PIAZZA *et al.*, 2010). Embora esta metodologia seja amplamente utilizada nos laboratórios, não há relação direta entre o sorotipo e virulência (SALYERS e WHITT, 2002). Resultados falsos positivos e falsos negativos podem ocorrer com uso desta metodologia isoladamente (YANG *et al.*, 2007). Ensaio com cultura celular também podem detectar essas bactérias. As tEPEC podem ser identificadas através do padrão de adesão localizado em cultura de células HEp-2 ou HeLa. Da mesma forma, o padrão de invasão de EIEC também pode ser observado na cultura dessas células (ROBINS-BROWNE *et al.*, 1992; LUSCHER e ALTWEGG, 1994; GRAY, 1995, PIAZZA *et al.*, 2010).

As estirpes de STEC podem ser detectadas pelo ensaio de citotoxicidade em células Vero, outra alternativa é a detecção da toxina utilizando ensaios imunológicos (PATON e PATON, 1998; PIAZZA *et al.*, 2010).

As ETEC podem ser identificadas através do ensaio de toxicidade em cultura de células de ovário de hamster Chinês (CHO) nas quais as toxinas LT produzidas pela bactéria causam alterações na morfologia celular visualizadas pelo alongamento destas células. Além disso, ensaios imunológicos como ELISA também podem detectar as toxinas (GUERRANT *et al.*, 1974; DONTA, MOON e WHIPP, 1974; GRAY, 1995).

O diagnóstico de EAEC e DAEC podem ser realizados principalmente pela detecção dos seus padrões de aderência em células HEp-2 ou HeLa, que são aderência agregativa e aderência difusa respectivamente (PIAZZA *et al.*, 2010).

Além de ensaios fenotípicos e imunológicos, os testes moleculares utilizando hibridização de DNA ou PCR estão disponíveis para o diagnóstico dos patotipos de *E.coli* diarreiogênicas, e tem como alvo a detecção dos genes de virulência (NATARO e KAPER, 1998; ARANDA *et al.*, 2004, ARANDA *et al.*, 2007; PIAZZA *et al.*, 2010).

### 2.3 *Salmonella*

As bactérias do gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, estão amplamente difundidas na natureza (água, solo, plantas e animais) podendo infectar tanto o homem quanto os animais (BARROW, 1993).

De acordo com sistema usado pelo CDC, taxonomicamente são reconhecidas duas espécies de *Salmonella*: *S. enterica* que compreende 6 subespécies: I, II, IIIa, IIIb, IV e VI e *S. bongori* com 1 subespécie (V). Membros dessas sete subespécies podem ser sorotipados em mais de 2500 diferentes sorovariedades de acordo com os antígenos somáticos (O) e flagelares (H). (BRENNER *et al.*, 2000; CDC, 2004; BOYLE *et al.*, 2007).

As seis subespécies de *Salmonella enterica* são referidas por um número romano ou por um nome: I-*Salmonella enterica* subesp. *enterica*; II-*Salmonella enterica* subesp. *salamae*; IIIa- *Salmonella enterica* subesp. *arizonae*, IIIb- *Salmonella enterica* subesp. *diarizonae*; IV- *Salmonella enterica* subesp. *houtenae*, VI- *Salmonella enterica* subesp. *indica* (BRENNER, *et al.*, 2000; CDC, 2003). A maioria dos mais de 2500 sorotipos pertence a *S. enterica* subsp. *Enterica* e os sorotipos mais comuns estão contidos nos grupos A, B, C1, C2, D e E. Além disso, as estirpes pertencentes a esses grupos causam aproximadamente 99% das infecções por *Salmonella* em humanos e animais de sangue quente. Sorotipos de *S. enterica* subespécies II, IIIa, IIIb, IV e VI e *S. bongori* são geralmente isolados de animais de sangue frio e do ambiente, mas raramente de humanos (CHIU, SU e CHU, 2005; BRENER *et al.*, 2000).

A infecção por *Salmonella* em humanos e animais continua a ser um problema de saúde pública preocupante em todo o mundo. Estirpes de *Salmonella* estão entre os mais importantes patógenos transmitidos por alimentos, levando a milhões de casos de diarreia e surtos no mundo todo, sendo *S. enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis o principal patógeno isolado atualmente (O'BRIEN *et al.*, 2002; GALANIS *et al.*, 2006; MÜRMAN *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Os sintomas da infecção usualmente aparecem 6-48 horas após a infecção e incluem febre, dor abdominal, diarreia (as fezes podem conter sangue, linfócitos e muco), náuseas e vômitos. A doença dura geralmente 4-7 dias, e a maioria das pessoas se recupera sem tratamento. No entanto, em crianças e idosos a

antibioticoterapia pode ser necessária (DARWIN e MILLER, 1999; LAI *et al.*, 2007; WHO, 2012).

Alguns sorotipos como *Salmonella* Typhimurium tem um amplo espectro de hospedeiros, infectando uma grande variedade de animais. Outros como *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A são altamente adaptados a humanos e não causam doença em outros hospedeiros (CHIU, *et al.*, 2004).

Existem quatro formas de infecção por *Salmonella*: gastroenterite, sepse, febre entérica e colonização assintomática. A gastroenterite, que é o foco deste trabalho, é a forma mais comum de salmonelose, sendo os sorovares *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium as principais causas (DARWIN e MILLER, 1999; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; GALANIS, *et al.*, 2006; HENDRIKSEN *et al.*, 2011).

## 2.4 *Shigella*

As espécies do gênero *Shigella* estão entre os patógenos bacterianos mais frequentemente isolados de pacientes com diarreia, incluindo 1,1 milhões de casos fatais. A maior parte dos episódios de diarreia e mortes causadas por *Shigella* ocorrem em crianças menores de 5 anos (KOTLOFF *et al.*, 1999; PARSOT, 2005; SCHROEDER e HILBI, 2008).

O gênero *Shigella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e contém quatro espécies que são responsáveis por doenças em humanos: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* e *S. sonnei* (NATARO E KAPER, 1998; PARSOT, 2005). Além disso, essas bactérias são intimamente relacionadas entre si e às estirpes de *E. coli* principalmente EIEC (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; PARSOT, 2005). Atualmente *Shigella* é considerada como um clone de *E. coli* (PUPO *et al.*, 2000).

*S. boydii* e *S. sonnei* são predominantes em áreas mais desenvolvidas, ao passo que *S. flexneri* e *S. dysenteriae* são responsáveis por shigelose endêmica em regiões menos desenvolvidas e em países em desenvolvimento. Epidemias de shigelose são quase sempre provocadas pela *S. dysenteriae* tipo I, produtora da toxina de Shiga (NA-UBOL *et al.*, 2006).

Trinta e seis sorotipos de *Shigella* são reconhecidos: 18 são de *S. boydii*, 13 de *S. dysenteriae* e 6 de *S. flexneri* enquanto que *S. sonnei* tem somente um

sorotipo. *Shigella* é adaptada aos seres humanos como único hospedeiro natural, mas em alguns casos pode infectar primatas superiores (LAN e REEVES, 2002).

A transmissão de *Shigella* ocorre por via fecal-oral, geralmente de pessoa para pessoa ou pela ingestão de água e alimentos contaminados. Aproximadamente 99% das infecções por *Shigella* ocorrem em países em desenvolvimento. Shigelose é uma infecção intestinal aguda, os sintomas podem variar de diarreia aquosa leve a disenteria bacilar inflamatória caracterizada pela destruição do epitélio do cólon que é provocada pela resposta inflamatória. A diarreia pode ser acompanhada de forte abdominal, cólicas, febre e fezes contendo sangue e muco. A doença é geralmente autolimitada, mas pode se tornar fatal em pacientes imunocomprometidos (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; PARSOT, 2005; SCHROEDER e HILBI, 2008).

A *Shigella* é altamente infecciosa, uma vez que a ingestão de apenas 100 bactérias pode resultar em doença, e se dissemina rapidamente em comunidades onde os padrões de higiene sanitários e o de nível de higiene pessoal são baixos (DuPONT, LEVINE e HORNICK, 1989; SCHROEDER e HILBI, 2008). Essa doença acomete principalmente crianças: 70% das infecções ocorrem em crianças com menos de 15 anos. Surtos epidêmicos ocorrem em creches, enfermarias e instituições de custódia. A doença endêmica em adultos é comum em homossexuais masculinos e em contatos domésticos de crianças infectadas (PILLAY *et al.*, 1997; ARAGON *et al.*, 2007; MURRAY, ROSENTAHL e PFALLER, 2006; LEE *et al.*, 2003).

## 2.5 *Yersinia*

O gênero *Yersinia*, também pertencente à família *Enterobacteriaceae*, inclui 11 espécies, das quais somente *Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis* e algumas estirpes de *Y enterocolitica* são patogênicas para humanos e alguns animais de sangue quente, ao passo que as outras espécies são de origem ambiental e podem, raramente, agir como oportunistas (FÁBREGA e VILA, 2012).

*Y. pseudotuberculosis* é a espécie de *Yersinia* menos comum nas doenças em humanos e pode causar linfadenite mesentérica acompanhada por febre e dor abdominal (LONG *et al.*, 2010). *Y. pestis* causa a peste bubônica caracterizadas por febre alta e ichaço inflamatório dos linfonodos nas axilas e virilha e peste

pneumônica caracterizada por sintomas típicos de pneumonia (febre, mal estar, e tosse) (MURRAY, ROSENHTAHL e PFALER, 2006).

*Y. enterocolitica* é a principal espécie do gênero associada com gastroenterite. Esta espécie é muito heterogênea do ponto de vista bioquímico, sorológico, quanto à patogenicidade e distribuição geográfica (FREDRIKSSON-AHOMAA e KORKEALA, 2003). Esta espécie é classificada por biotipo (com base nas características fenotípicas) em 6 biogrupos, 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5, e por sorotipagem, em mais de 57 sorogrupos O (com base nos seus antígenos de superfície, o LPS) (FÁBREGA e VILA, 2012). Cinco dos 6 biogrupos (1B e 2-5) são potenciais patógenos humanos e os sorogrupos O:3 (biogrupo 4), O:5,27 (biogrupos 2 e 3), O:8 (biogrupo 1B) e O:9 (biogrupo 2) são mais frequentemente isolados de amostras clínicas do mundo todo (VIRDI e SACHDEVA, 2005; FÁBREGA e VILA, 2012).

As espécies patogênicas de *Yersinia* estão amplamente distribuídas no meio aquático e em animais, como suínos, ratos, esquilos e animais domésticos que servem como reservatórios de estirpes patogênicas para o homem (HAYASHIDANI *et al.*, 1995; BOTTONE, 1997). A gastroenterite por *Y. enterocolitica* é transmitida pela ingestão de água e alimentos contaminados com essas bactérias.

*Yersinia* é um microrganismo psicrófilo, cresce em temperaturas variando de 0 °C a 44°C, sendo a ótima entre 25 °C a 28°C. Resiste bem ao congelamento, podendo sobreviver em alimentos congelados. É sensível ao calor, sendo destruído através da pasteurização (BOCKEMÜHL e WONG, 2003; FALCÃO e FALCÃO, 2006).

*Y. enterocolitica* é uma causa comum de enterocolite na Escandinávia e outros países europeus e nas áreas mais frias da América do Norte (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; GALINDO *et al.*, 2011). No Brasil, infecções causadas por esta espécie não são comuns. Tal fato deve-se, ou a pequena ocorrência do microrganismo em nosso país, ou a não utilização das técnicas ideais para isolamento e caracterização dessa bactéria (FALCÃO e FALCÃO, 2006).

## 2.6 *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* está atualmente classificado na família *Aeromonadaceae* e compreende bacilos gram-negativos anaeróbios facultativos, catalase e oxidase positivas, fermentadores da glicose e de outros carboidratos (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007; PARKER e SHAW 2011).

As bactérias do gênero *Aeromonas* estão subdivididas em dois grandes grupos com base na temperatura ótima de crescimento desses microorganismos. O grupo das psicrófilas, é constituído por bactérias que causam doenças em peixes, são imóveis, e apresentam crescimento ótimo em temperaturas entre 22°C a 25°C. O grupo das mesófilas compreende bactérias móveis, com temperatura ótima de crescimento entre 35°C a 37°C, e que estão associadas com uma variedade de infecções em humanos. (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007; JANDA e ABBOTT, 2010).

Atualmente 24 espécies de *Aeromonas* são conhecidas, sendo *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veroni* biovar sóbria as espécies frequentemente isoladas de amostras clínicas (JANDA e ABBOTT, 2010; PARKER e SHAW 2011).

As duas principais doenças causadas por *Aeromonas* em seres humanos são gastroenterite e infecções de feridas. Além disso, essas bactérias podem também causar septicemia em imunocomprometidos, e um número de enfermidades pouco relatadas tais como peritonite, meningite, infecções nos olhos, ossos e articulações (ABBOTT *et al.*, 2003; VALLY *et al.*, 2004; DIXON, 2008; TULSIDAS, ONG e CHAN, 2008).

*Aeromonas* podem ser isoladas a partir de praticamente todos os nichos ambientais onde existem ecossistemas bacterianos, incluindo animais domésticos, espécies de invertebrados, aves e frutos do mar, e principalmente rios, lagos, água mineral, água potável e esgotos (ALAVANDI e ANANTHAN, 2003; RAZZOLINI *et al.*, 2008; RAHMAN *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2009; COELHO *et al.*, 2010). Esta variedade de distribuição contribui para uma constante exposição e interações entre essas bactérias e os seres humanos (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007; JANDA e ABBOTT, 2010).



As infecções causadas pelas estirpes de *Aeromonas* geralmente se devem a ingestão de água e alimentos contaminados (GHENGHESH *et al.*, 2008; JANDA e ABBOTT, 2010).

Diarreia associada à *Aeromonas* ocorre em adultos e crianças tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento e varia desde uma diarreia aquosa moderada, auto-limitada a uma disenteria mais severa e invasiva (JANDA e ABBOTT, 2010). Nos países desenvolvidos, a frequência de *Aeromonas* varia entre 2,2% a 10% e nos países em desenvolvimento a frequência varia de 1-88% (PAZZAGLIA *et al.*, 1991; ESSERS, *et al.*, 2000; JANDA e ABBOTT, 2010). A espécie predominante nos casos de diarreia por *Aeromonas* varia em cada país, sendo que no Brasil *Aeromonas caviae* é considerada a principal espécie (GHENGHESH *et al.*, 2008).

## 2.7 *Plesiomonas shigelloides*

O gênero *Plesiomonas* possui somente uma espécie: *P. shigelloides*, um bacilo gram-negativo móvel e oxidase positiva, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Foi isolado pela primeira vez por Ferguson e Henderson em 1947 e denominada como C27 (FERGUSON *et al.*, 1974; FALCÃO *et al.*, 2007).

Seus principais habitats são a água doce e salgada, e o intestino de mariscos, peixes de água doce, répteis, anfíbios e mamíferos como gatos, cães e suínos (FERGUSON *et al.*, 1974; INGRAM, MORRISON, JR., LEVITZ, 1987; FALCÃO *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2008). Os animais, alimentos e água contaminados são considerados os veículos de transmissão de *Plesiomonas* para o homem (FALCÃO *et al.*, 2007).

*P. shigelloides* é relacionada fenotipicamente ao gênero *Aeromonas* (Plesio-próximo; monas - de *Aeromonas*) e ambas faziam parte da família *Vibrionaceae* (JAGGER, 2000). No entanto estudos genéticos indicaram que *P. shigelloides* é intimamente relacionada à família *Enterobacteriaceae* na qual está incluída atualmente (JANDA, 1998).

O crescimento da *P. shigelloides* em água depende muito da temperatura, disponibilidade de nutrientes e do nível de poluição da água (essas bactérias preferem água contaminada com esgoto). Há vários relatos de incidência de

infecções causadas por *P. shigelloides* durante estações quentes e ausência em estação fria. Em países de clima tropical, essa diferença não é observada. Além disso, essas bactérias são dependentes de uma oxigenação adequada e são tolerantes a pH elevados (TSUKAMOTO *et al.*, 1978; JAGGER, 2000; MONDINO, NUNES e RICCIARDI, 1995).

A doença mais comumente causada por *P. shigelloides* é a gastroenterite caracterizada por febre, calafrio, dor abdominal, dor de cabeça, náusea, vômito diarreia aquosa ou mucosa e às vezes com sangue. Na maioria dos casos a diarreia é auto-limitante (MANDAL e WHALE e MORSON, 1982; TSUKAMOTO *et al.*, 1978; ALCANTARA *et al.*, 1984; VAN LOON *et al.*, 1989; JAGGER, 2000; FALCÃO *et al.*, 2007). A maior incidência de infecção por *P. shigelloides* ocorre em pessoas que vivem em países de clima tropical e subtropical e que consomem alimentos marinhos crus (KAIN e KELLY, 1989; ABBOTT, 2003).

Além da gastroenterite, *P. shigelloides* também pode causar colite pseudomembranosa e infecções extra-intestinais como sepse, meningoencefalite, osteomielite e colecistite (CLAESSON *et al.*, 1984; INGRAM, MORRISON, JR e LEVITZ, 1987; VAN LOON, *et al.*, 1989; OZDEMIR *et al.*, 2010).

As manifestações clínicas das gastroenterites causadas por *P. shigelloides* incluem diarreia secretória (aquosa), colite disentérica, ou uma doença subaguda/crônica com duração de 2 semanas a 3 meses (AHMAD, AGGARWAL e AHAMED, 1998; JAGGER, 2000).

## 2.8 *Vibrio*

O gênero *Vibrio*, pertencente à família *Vibrionaceae*, é composto por mais de 100 espécies e está entre as bactérias mais isoladas de águas estuárias e marinhas (onde fazem parte da microbiota natural) (JANDA *et al.*, 1988; THOMPSON, IIDA e SWINGS, 2004; LIPP, HUQ e COLWELL, 2002; HARVELL *et al.*, 1999; GRIMES, 1991). Vibrios são bacilos curvos, móveis, que se movimentam através de um flagelo polar, são gram negativos, anaeróbios facultativos, oxidase positiva, e reduzem nitrato a nitrito (KAPER, MORRIS e LEVINE, 1995).

Dentre todas essas espécies, cerca de 11 estão implicadas em infecções humanas, sendo que as mais importantes são: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e

*V. vulnificus*. (JANDA *et al.*, 1988; THOMPSON, IIDA e SWINGS, 2004). *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são responsáveis pela maioria das infecções bacterianas relacionadas com o consumo de mariscos e das infecções de feridas abertas em nadadores e pescadores (LIPP, HUQ e COLWELL, 2002).

*V. parahaemolyticus*, em alguns países, é a principal espécie de *Vibrio* responsável por causar gastroenterite devido ao consumo de água e mariscos mal cozidos contaminados com a bactéria (MEAD *et al.*, 1999; MCLAUGHLING *et al.*, 2005). Os sintomas mais comuns da doença são diarreia, cólicas abdominais, náuseas e vômito. A diarreia induzida é de natureza secretória e auto-limitada. Em alguns casos, a doença se agrava e apresenta caráter semelhante à cólera (JANDA, *et al.*, 1988).

Cerca de 200 sorogrupos de *V. cholerae* já foram reconhecidos, mas somente dois deles, O1 e O139, que produzem a toxina colérica, foram associados com grandes epidemias de cólera (LIPP, HUQ e COLWELL, 2002). A cólera foi responsável pela morte de dezenas de milhares de pessoas na Inglaterra entre os anos 1930 e 1950. Após isso, vários surtos de cólera já foram registrados em áreas endêmicas, sendo o último grande surto registrado no Haiti em 2010 (THOMPSON, IIDA e SWINGS, 2004; CDC, 2010; CHIN *et al.*, 2011).

A maioria dos casos de cólera acontece nos meses quentes e principalmente entre pessoas que consomem água e frutos do mar, como por exemplo, ostras, camarões e peixes (crus ou mal cozidos) contaminados com o *V. cholerae* (DANIELS e ALIZERA, 2000; THOMPSON, IIDA e SWINGS, 2004).

A infecção por *V. cholerae* pode variar de colonização assintomática, ou uma diarreia branda a diarréia grave rapidamente fatal. (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006). No intestino essas bactérias aderem ao epitélio e produzem uma enterotoxina, a toxina colérica (CT) semelhante estrutural e funcionalmente à toxina termolábil da ETEC (REIDL e KLOSE, 2002). Esta toxina provoca secreção ativa de cloreto, sódio, potássio, bicarbonato e água no lúmen intestinal, dando origem a uma diarréia secretória aquosa (aspecto de água de arroz) tão intensa que pode levar à morte (KAPER, MORRIS e LEVINE, 1995; SEARS e KAPER, 1996).

## 2.9. *Campylobacter*

O gênero *Campylobacter*, membro da família *Campylobacteriaceae*, consiste de pequenos bacilos gram-negativos em forma de S, asas de gaivota, que se movimentam rapidamente através de flagelos unipolar ou bipolar. Este gênero compreende cerca de 20 espécies sendo *C. jejuni* a principal causa de diarreia humana aguda nos países desenvolvidos. Cerca de 90% dos casos de campilobacteriose humana são causadas por *C. jejuni*. A fração restante deve-se principalmente a *C. coli* (JANSSEN *et al.*, 2008).

As reações bioquímicas que diferenciam *Campylobacter* de outras bactérias são poucas devido a sua incapacidade de fermentar ou oxidar os carboidratos usuais disponíveis no laboratório. Esses enteropatógenos são oxidase positiva, reduzem nitrato a nitrito e a catalase é um dos poucos testes disponíveis para a diferenciação entre as espécies (PENNER, 1988). A maior parte das espécies de *Campylobacter* é microaerófila. *C. jejuni* e *C. coli* são espécies termofílicas fastidiosas que requerem meios de cultura especiais suplementados com antibióticos para inibir o crescimento de outras bactérias. Necessitam de ambiente microaerofílico (5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> e 85% de N<sub>2</sub>) e temperatura de 42°C para o seu crescimento (NACHAMKIN, 2003).

*Campylobacter* pode colonizar a mucosa intestinal de muitas espécies de animais de sangue quente. Aves são os principais reservatórios de *C. jejuni* e suínos de *C. coli*. A contaminação fecal de carne de frango durante o abate é a considerada a principal fonte de infecção por este microorganismo (PENNER, 1998; HEUER *et al.*, 2001; NEWELL, 2002; THAKUR e GEBREYS, 2005;).

A ingestão de carne de aves e de porco mal cozidas, leite e água contaminados pode levar ao desenvolvimento de uma infecção intestinal auto-limitada (ON 1996; SAMUEL *et al.*, 2004; JANSSEN *et al.*, 2008). Condições que impedem a produção de ácido pelo estômago, tais como gastrite atrófica, anemia perniciosa e medicamentos que diminuem a acidez gástrica predispoem à infecção por *Campylobacter*, pois esta bactéria é sensível a níveis baixos de pH (NEALL *et al.*, 1996; CABADA e WHITE JR, 2008).

*Campylobacter* foi considerado a maior causa de diarreia nos países desenvolvidos até o início do século XXI. A incidência dessa bactéria aumentou

exponencialmente durante a última década do século XX, provavelmente pela melhoria nos métodos de detecção e diagnóstico dessa bactéria (WASSENAAR, 1997; JANSSEN *et al.*, 2008). A maior parte das infecções por *Campylobacter* ocorrem como casos esporádicos, e surtos são raramente reconhecidos (JANSSEN *et al.*, 2008).

As doenças primárias causadas por *Campylobacter* são sepsse e principalmente gastroenterite (ON, 1996). Os sintomas mais comuns da gastroenterite são diarreia aquosa com sangue e leucócitos, cólicas abdominais, náuseas e febre. Ou ainda pode haver somente diarreia aquosa não inflamatória com ausência de leucócitos e sangue. Em uma pequena parte dos pacientes a fase aguda pode ser seguida por graves complicações auto-imunes: a síndrome de Guillain-Barré e a artrite infecciosa reativa (WASSENAAR, 1997; GILLESPIE *et al.*, 2006; JANSSEN *et al.*, 2008; WHO, 2011).

#### 2.10 DETECÇÃO LABORATORIAL DE *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Y. enterocolitica*, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp, *P. shigelloides* e *Campylobacter* spp

A detecção laboratorial de *Salmonella* spp e *Shigella* spp é realizada de rotina nos laboratórios através da coprocultura, enquanto que *Y. enterocolitica*, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp e *P. shigelloides* são pesquisados somente por alguns laboratórios de referência.

*Salmonella* spp e *Shigella* spp podem ser detectadas a partir da cultura de fezes em meios de cultivo seletivos e diferenciais como ágar XLD e ágar SS, e confirmados com a sorologia (FARMER, 2003).

*Vibrio* spp, *Aeromonas* spp e *P. shigelloides* são detectados principalmente pelo cultivo de fezes, enriquecidas em água peptonada alcalina, e subcultivadas em ágar TCBS para o isolamento de *Vibrio* spp, e ágar MacConkey ou qualquer meio de cultura sem inibidores para o isolamento de *Aeromonas* spp e *P. shigelloides*. (JANDA *et al.*, 1988; JAGGER, 2000; FARMER, JANDA e BIRKHEAD, 2003 JANDA e ABBOT, 2010; PARKER e SHAW, 2011).

As principais espécies de *Campylobacter* que causam diarreia podem ser detectadas em ágar seletivo para *Campylobacter* com ou sem sangue, e em condições de cultivo diferentes das outras bactérias pesquisadas na coprocultura.

Enquanto a maioria das bactérias patogênicas cresce em 24 horas e a uma temperatura de 35°C, as espécies de *Campylobacter* possuem um crescimento mais lento (48 horas) e em temperatura ótima de 42°C. Além disso, requerem atmosfera de microaerofilia para crescer (PENNER, 1988; NACHAMKIN, 2003).

*Y. enterocolitica* pode ser isolada de fezes a partir do cultivo em meios seletivos como ágar MacConkey e ágar cefsulodin-irgasan-novobiocina (CIN), à temperatura de 25 °C. Métodos baseados em análise de DNA, como PCR e hibridização, podem detectar este patógeno mais rapidamente e com maior sensibilidade (FREDRIKSSON-AHOMA e KORKEALA, 2003; BACKEMUHL e WONG, 2003).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo detectar, isolar e caracterizar bactérias enteropatogênicas, a partir de culturas de amostras fecais de pessoas com diarreia, utilizando métodos convencionais e moleculares.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Fazer a triagem de amostras fecais quanto à presença das seguintes bactérias enteropatogênicas: *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp, *Plesiomonas shigelloides* e *Campylobacter* spp, utilizando os métodos microbiológicos convencionais.

-Realizar a triagem de amostras fecais quanto à presença de *E. coli* diarreio gênicas, através da amplificação de genes de virulência, marcadores que definem cada estirpe.

-Isolar e caracterizar bioquimicamente as bactérias enteropatogênicas isoladas.

-Avaliar a incidência das bactérias causadoras de diarreia.

-Determinar o padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos dos enteropatógenos encontrados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA

Foram analisadas 400 amostras de fezes diarreicas, de adultos e crianças. Destas, 305 foram provenientes do Laboratório Central do Estado (LACEN) e 95 do Laboratório Municipal de Curitiba (LMC). As amostras do LACEN foram coletadas no período de junho de 2010 a janeiro de 2012 e as do LMC de setembro de 2010 a dezembro de 2011. As amostras fecais foram transportadas 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 da UFPR (CEP: 320SM102.06.12, CAEE: 0053.0.091.000-06).

### 4.2 METODOLOGIAS EMPREGADAS

Para a detecção dos enteropatógenos foram empregadas duas abordagens: a coprocultura convencional utilizando meios para a detecção de *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Vibrio* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* e a PCR para a triagem e identificação das estirpes diarreiogênicas de *E. coli* (DEC). As colônias de DEC detectadas por PCR foram posteriormente identificadas bioquimicamente utilizando o API 20E.

### 4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As condições de cultivo para a coprocultura (método microbiológico convencional) e para a detecção das DEC estão descritas a seguir. Foram utilizados meios de cultura das seguintes procedências: Difco (TCBS e TSA), Himedia (XLD) e Oxoid (MacConkey e CCDA).

#### 4.3.1. Meios de cultura e condições utilizadas para a realização da coprocultura

Para o cultivo e isolamento das bactérias enteropatogênicas, as amostras fecais foram semeadas em meios seletivos e diferenciais. Para a cultura de *Yersinia*



*enterocolitica*, o material fecal foi semeado em ágar MacConkey (MC) e mantido por 18 a 24 horas à temperatura ambiente, uma vez que a temperatura ótima de crescimento dessa espécie é 25°C. Para o isolamento de *Salmonella* e *Shigella*, outra porção de fezes foi semeada em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e incubada à 35°C/18-24 horas.

Para o isolamento de *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides*, as fezes foram semeadas água peptonada alcalina (APA) pH 8,5 e incubadas à 35°C/18-24 horas. A seguir, uma alíquota do crescimento bacteriano em APA foi semeada em ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS), para o isolamento de *Vibrio*; em ágar Triptona de Soja (TSA), para o isolamento de *Aeromonas* e *P. shigelloides* e os meios foram incubados à 35°C/18-24 horas.

Uma vez que o *Campylobacter* tem exigências de crescimento diferente dos demais enteropatógenos pesquisados, para o isolamento dessa bactéria as fezes foram semeadas em Ágar Seletivo para *Campylobacter* sem Sangue (CCDA-Modificado por Preston) suplementado com cefoperazona e anfotericina B (suplemento SRO155E, Oxoid). O meio foi incubado a 42°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia, que foi obtida com a utilização do *sachet* CampyGen (Oxoid) e o uso de jarra de anaerobiose.

#### 4.3.2 Cultivo para a detecção de estirpes diarreogênicas de *E. coli*

A seguinte estratégia foi utilizada para a detecção das DEC. Inicialmente, DNA extraído de um “pool” de bactérias foi analisado através de PCR multiplex para a presença de genes marcadores de DEC (etapa de triagem). Se nesta etapa o resultado foi positivo (amplificação de fragmentos de genes marcadores de DEC), a análise procedeu para a segunda etapa, que foi a identificação da colônia de DEC. Nesta etapa até 100 colônias foram testadas utilizando apenas um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específico para a categoria de DEC detectada na etapa de triagem.

Para a etapa de triagem das *E.coli* diarreioogênicas, as fezes foram cultivadas em ágar MacConkey e incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 18 a 24 horas, em aerobiose. As colônias desenvolvidas no quadrante primário de cada cultura foram coletadas com uma alça bacteriológica e transferidas para um tubo tipo Eppendorf, capacidade

de 1,5 mL, contendo 500 µL de água destilada estéril e a suspensão utilizada para a extração de DNA (item 4.4).

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura (OLSVIK e STROCKBINE, 1993). As suspensões de bactérias (item 4.3) 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.

#### 4.5 PCR

##### 4.5.1 Bactérias utilizadas como controles da PCR

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

TABELA 1- BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO CONTROLES DA PCR

<b>Bactéria</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Procedência</b>
EPEC E2348/69	<i>eae<sup>+</sup>, bfpA<sup>+</sup></i>	UNIFESP <sup>1</sup>
STEC 0157:H7	<i>stx1<sup>+</sup>, stx2<sup>+</sup>, eae<sup>+</sup></i>	IAL <sup>2</sup>
EIEC 307	<i>ial<sup>+</sup>, ipaH<sup>+</sup></i>	AIL <sup>2</sup>
ETEC H1040	<i>st<sup>+</sup>, lt<sup>+</sup></i>	UNIFESP <sup>1</sup>
EAEC 2391	<i>CVD432<sup>+</sup></i>	IAL <sup>2</sup>
DAEC C 1845	<i>daaE<sup>+</sup></i>	UNIFESP <sup>1</sup>
<i>E.coli</i> ATCC 25922*	-	Oxoid
<i>E.coli</i> ATCC DH10B*	-	Invitrogen

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Paulo - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, <sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz, \*Não contém genes de virulência de DEC.

A detecção dos genes marcadores das DEC foi realizada utilizando PCR multiplex, de acordo com FIALHO, 2008. Os genes alvos utilizados estão indicados na Tabela 2, juntamente com as seqüências dos respectivos oligonucleotídeos iniciadores. As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 5,0 µL do extrato bruto de DNA, 2,5 µL de tampão da Taq DNA Polimerase Máxima® Hot Start (10X), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 1,0 µL de dNTP (0,2 mM), 10 pmol de cada iniciador e 0,2 µL de Taq DNA Polimerase Máxima® Hot Start (5U / µL, Fermentas).

TABELA 2 – INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS COM *E.coli* DIARREOGÊNICAS

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 G1 R AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC <sup>1</sup>	150
	<i>stx2</i>	F GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC <sup>1</sup> R TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G <sup>1</sup>	255
	<i>eae</i>	F GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC <sup>1</sup> R CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG <sup>1</sup>	384
EPEC	<i>bfpA</i>	F AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC <sup>2</sup> R GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA <sup>2</sup>	324
	<i>eae</i>	F GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC <sup>1</sup> R CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG <sup>1</sup>	384
ETEC	<i>lt</i>	F GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC <sup>2</sup> R GG TCT CTA TAT TCC CTG TT <sup>2</sup>	450
EIEC	<i>ial</i>	F GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA <sup>2</sup> R GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC <sup>2</sup>	650
	<i>ipaH</i>	F GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C <sup>3</sup> R GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC <sup>3</sup>	600

<sup>1</sup> PATON et al., J. Clin. Microbiol. 40: 271-274, 2002; <sup>2</sup> LOPEZ-SAUCEDO et al., Emerg. Infect. Dis. 9:127-131, 2003; <sup>3</sup> ARANDA et al., J. Clin. Microbiol. 42: 5849-5853, 2004; <sup>4</sup> VIDAL et al., J. Clin. Microbiol. 43: 5362-5365, 2005; <sup>5</sup> LU et al., J. Clin. Microbiol. 38: 2076-2080, 2000; <sup>6</sup> STACY-PHIPPS et al., J. Clin Microbiol. 33: 1054-1059, 1995.

Categoria das DEC	Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3') e fonte	Tamanho do Fragmento pb
EAEC	<i>CVD432</i>	F CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT <sup>3</sup> R CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T <sup>3</sup>	630
DAEC	<i>daaE</i>	F GAA CGT TGG TTA ATG TGG GGT AA <sup>4</sup> R TAT TCA CCG GTC GGT TAT CAG T <sup>4</sup>	542
Controle	<i>16S</i>	F CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG <sup>5</sup> R ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC <sup>5</sup>	995

<sup>1</sup> PATON et al., J. Clin. Microbiol. 40: 271-274, 2002; <sup>2</sup> LOPEZ-SAUCEDO et al., Emerg. Infect. Dis. 9:127-131, 2003; <sup>3</sup> ARANDA et al., J. Clin. Microbiol. 42: 5849-5853, 2004; <sup>4</sup> VIDAL et al., J. Clin. Microbiol. 43: 5362-5365, 2005; <sup>5</sup> LU et al., J. Clin. Microbiol. 38: 2076-2080, 2000; <sup>6</sup> STACY-PHIPPS et al., J. Clin Microbiol. 33: 1054-1059, 1995.

O protocolo desenvolvido por FIALHO (2008) envolve 2 sistemas de PCR-multiplex, ou seja, são realizadas 2 reações distintas para a detecção de DEC. O sistema 1 foi desenvolvido para a detecção dos seguintes genes: *stx1*, *stx2*, *eae*, *bfpA*, *daa*, *lt*, *st*, *ial* e *16S*. O sistema 2 para os genes *ipaH*, *CVD432*, *daaE* e *16S*. O gene *16S* rRNA codifica o RNA ribossomal *16S* presente na subunidade menor do ribossomo. É um gene essencial, presente em todas as bactérias (CLARRIDGE, 2004). Assim, a função dos iniciadores *16S* utilizados em ambos os sistemas de PCR-multiplex é servir como um controle interno de amplificação.

As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96 Applied Biosystems. O programa utilizado para o sistema 1 foi o seguinte: 95°C, 2 minutos (1 ciclo); 95°C, 30 segundos (35 ciclos); 55°C, 30 segundos; 72°C, 1 minuto (35 ciclos) e um ciclo final de 72°C, 5 minutos. Para o sistema 2 foram utilizadas as mesmas condições, exceto pela temperatura de anelamento que foi 58°C.

#### 4.6 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

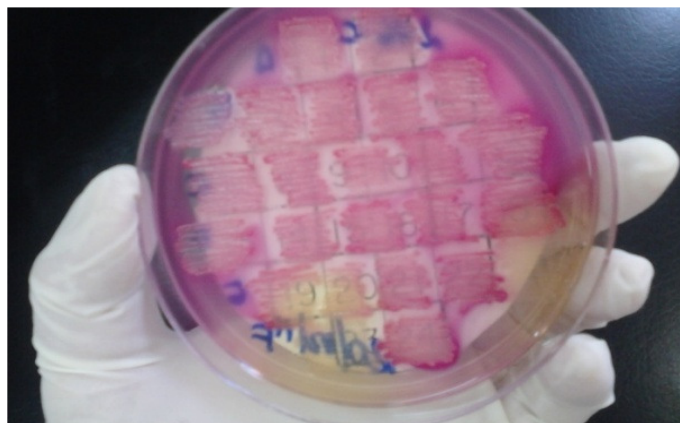
Os produtos das reações de PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% utilizando como tampão o Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X concentrado. A separação eletroforética foi realizada a 38 V durante 2 horas. Os géis foram corados durante 15 minutos em solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989) visualizados em transiluminador ultravioleta e a imagem registrada com câmera digital.

## 4.7 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS

### 4.7.1 Isolamento das *E.coli* diarreogênicas

Na etapa de triagem por PCR foi utilizado DNA extraído de uma mistura de bactérias (item 4.3). Sendo assim, 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 (figura 1) e incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas. O DNA de cada colônia foi extraído como descrito no item 4.4 e foram testadas em grupos de 10 utilizando apenas um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específico para a categoria de DEC detectada na etapa de triagem. O grupo de 10 colônias que apresentou amplificação do marcador para DEC teve cada uma das 10 colônias isoladas testadas individualmente, da mesma forma. As colônias positivas para os genes de virulência foram estocadas em TSB/glicerol 20% a  $-20^\circ\text{C}$ .

FIGURA 1- ETAPA DE ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS DE DEC



FONTE: O autor (2012)

NOTA: Placa de MC com colônias suspeitas de DEC, inoculadas em áreas numeradas.

#### 4.7.2 Caracterização bioquímica das *E.coli* diarreogênicas

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

#### 4.7.3 Isolamento e identificação bioquímica das bactérias patogênicas pesquisadas na coprocultura convencional

Como existe uma vasta microbiota presente no intestino, as bactérias isoladas na coprocultura que apresentaram, nos meios XLD, TCBS, CCDA, MC e TSA características compatíveis com os enteropatógenos pesquisados foram antes submetidas à uma etapa de triagem como descrito a seguir.

##### a ) *Salmonella* e *Shigella*

O XLD é um meio de cultura seletivo para *Salmonella* e *Shigella* e diferencial para produção de H<sub>2</sub>S e fermentação da lactose. As colônias de *Salmonella* produzem H<sub>2</sub>S e se coram em preto como mostra a figura 2A. *Shigella* não produz H<sub>2</sub>S e portanto permanece incolor, contra o meio de coloração vermelha. As colônias suspeitas de *Salmonella* e *Shigella* foram inoculadas nos meios de triagem ágar KIA (fermentação da glucose e lactose, produção de gás a partir da glucose e H<sub>2</sub>S) e ágar MILi (motilidade, indol, lisina) para verificar se apresentavam características compatíveis com as esperadas. Perfil esperado para *Salmonella*: móvel, fermenta glucose com produção de gás, não fermenta a lactose, descaboxila a lisina, produz H<sub>2</sub>S e é indol negativo. Perfil de *Shigella*: imóvel, fermenta glucose e não produz gás, não fermenta a lactose, lisina negativa, não produz H<sub>2</sub>S e indol variável (FARMER, 2003; BOPP *et al.*, 2003).

b) *Vibrio* spp

O TCBS é um meio de cultura seletivo para *Vibrio* spp. e diferencial para H<sub>2</sub>S (cor preta) e sacarose (cor amarela). As colônias de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, que são as principais espécies que causam gastroenterite ficam amarelas e verdes respectivamente, neste meio. As colônias suspeitas de *Vibrio* que apresentaram reação de citocromo oxidase positiva foram inoculadas nos meios de triagem KIA e LIA (descarboxilação da lisina e produção de H<sub>2</sub>S). Perfil de *Vibrio*: fermenta a glucose sem produção de gás, não fermenta a lactose, descarboxila a lisina e não produz H<sub>2</sub>S (FARMER, 2003).

c) *Yersinia enterocolitica*

MacConkey é um meio de cultura seletivo para bactérias gram negativas e diferencial para a lactose. As bactérias que fermentam a lactose se coram na cor rosa escuro e as que não fermentam, como *Y. enterocolitica*, permanecem transparentes contra o meio de cultura rosa claro. As colônias lactose negativa que cresceram no ágar MC à 25°C foram inoculadas nos meios de triagem KIA, MILi e Uréia para ver se apresentavam perfil de *Y. enterocolitica*: fermenta a glucose sem produção de gás, não fermenta a lactose, não produz H<sub>2</sub>S, hidrolisa a uréia e é variável para as outras reações analisadas na triagem (BOCKEMUHL e WONG, 2003; FARMER, 2003).

As colônias que obtiveram um perfil compatível com *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp. e *Y. enterocolitica* foram identificadas utilizando testes convencionais e sorologia de acordo com BOPP e colaboradores (2003), FARMER (2003), FARMER, JANDA e BIRKHEAD (2003) e BOCKEMUHL e WONG (2003).

d) *Aeromonas* e *P. shigelloides*

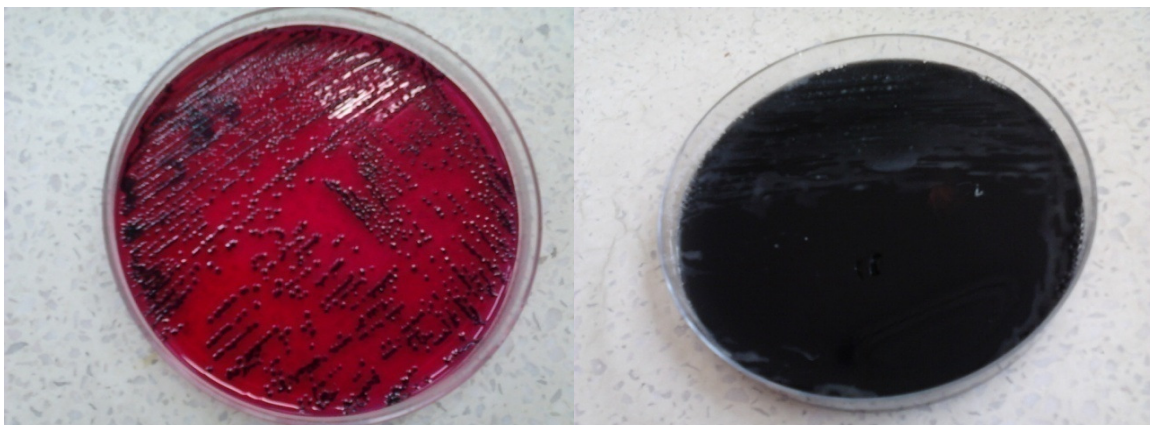
Nas placas de ágar TSA, um meio de cultura que não contém compostos seletivos e diferenciais, foram pesquisadas *Aeromonas* e *P. shigelloides*. Colônias isoladas foram submetidas ao teste da oxidase, e as colônias oxidase positivas

foram submetidas à triagem com o KIA, para verificar a fermentação de glicose. As colônias oxidase positivas e fermentadoras de glicose foram inoculadas em Miller Hinton ágar e testadas quanto a resistência ao agente vibriostático O129. As colônias resistentes ao O129 (perfil de *Aeromonas*) e sensíveis ao O129 (perfil de *P. shigelloides*) foram encaminhadas para a etapa de identificação de acordo com HORNEMAN e colaboradores (2007) e ABBOTT e colaboradores (2003).

#### e) *Campylobacter*

O crescimento bacteriano na placa de CCDA, à temperatura de 42 °C e com aspecto leitoso, como mostra a figura 2B, é considerado uma triagem para a detecção de *Campylobacter* pois o meio suplementado, a atmosfera microaerofílica e a temperatura favorecem o crescimento deste gênero bacteriano. As colônias suspeitas de *Campylobacter* foram analisadas quanto à morfologia e reação tintorial utilizando a coloração de Gram. Colônias apresentando morfologia sugestiva deste gênero (em S, asas de gaivota) foram testadas para as provas da oxidase e catalase, hidrólise do hipurato, perfil de resistência ao ácido nalidíxico e à cefalotina conforme NACHAMKIN, (2003), para a identificação das espécies.

FIGURA-2 ASPECTO DAS COLÔNIAS DE *Salmonella* spp e *Campylobacter* spp. EM ÁGAR SELETIVO



FONTE: O autor (2012)

NOTA: **A.** Colônias H<sub>2</sub>S<sup>+</sup> (cor preta) de *Salmonella* spp. em ágar XLD **B.** Colônias de *Campylobacter* spp. na cor branca (aspecto leitoso) em ágar CCDA suplementado



#### 4.10 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo E-test para *Campylobacter*, e pelo método de disco-difusão para as demais bactérias, de acordo com os seguintes documentos do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2011: M100-S21 (para Enterobactérias) e M45-A2 (para *Aeromonas* e *Campylobacter*).

#### 4.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o teste exato de Fisher bidirecional, realizado com o programa Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), e o teste de Chi-quadrado ou o teste exato utilizando a tabela contingência  $r \times c$  ( $r \times c$  Exact Contingency Table, disponível no seguinte endereço quando apropriado:

[http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact\\_NROW\\_NCOLUMN\\_form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact_NROW_NCOLUMN_form.html)).

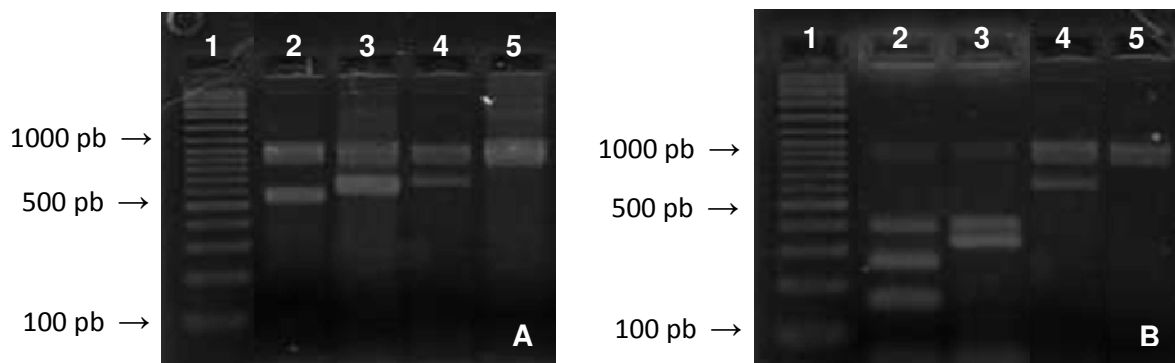
Foi considerado como diferença estatisticamente significativa valor de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

A figura 3 mostra os perfis obtidos para as bactérias utilizadas como controles positivos e negativos (Tabela 1) na PCR-Multiplex para detecção de genes de virulência de DEC.

### 5.1. PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE REFERÊNCIA DE *E.coli* DIARREOGÊNICAS E CONTROLES NEGATIVOS NOS SISTEMAS DE PCR MULTIPLEX

FIGURA- 3 PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS DAS *E.coli* DIARREIOGÊNICAS E CONTROLES NEGATIVOS



Eletroforese em gel de agarose a 2,0% do produto de PCR dos controles positivos e negativos (A: Sistema 2; B: Sistema 1) **A** 1. Marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder Fermentas; 2. DAEC-controle positivo para *daa* (542 pb); 3. EIEC-controle positivo para *ipaH* (600 pb); 4. EAEC-controle positivo para *CVD 432* (630 pb); 5. *E.coli* ATCC 25922-controle negativo **B** 1. Marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder Fermentas; 2. STEC-controle positivo para *stx1* (150 pb), *stx2* (255 pb), *eae* (384 pb) 3. EPEC-controle positivo para *bfpA* (324 pb), *eae* (384 pb) 4. EIEC controle positivo para *ial* (650 pb); 5. *E.coli* DH10B-controle negativo. Gene *16S* amplificado em todos os controles- controle da reação de PCR (995 pb).

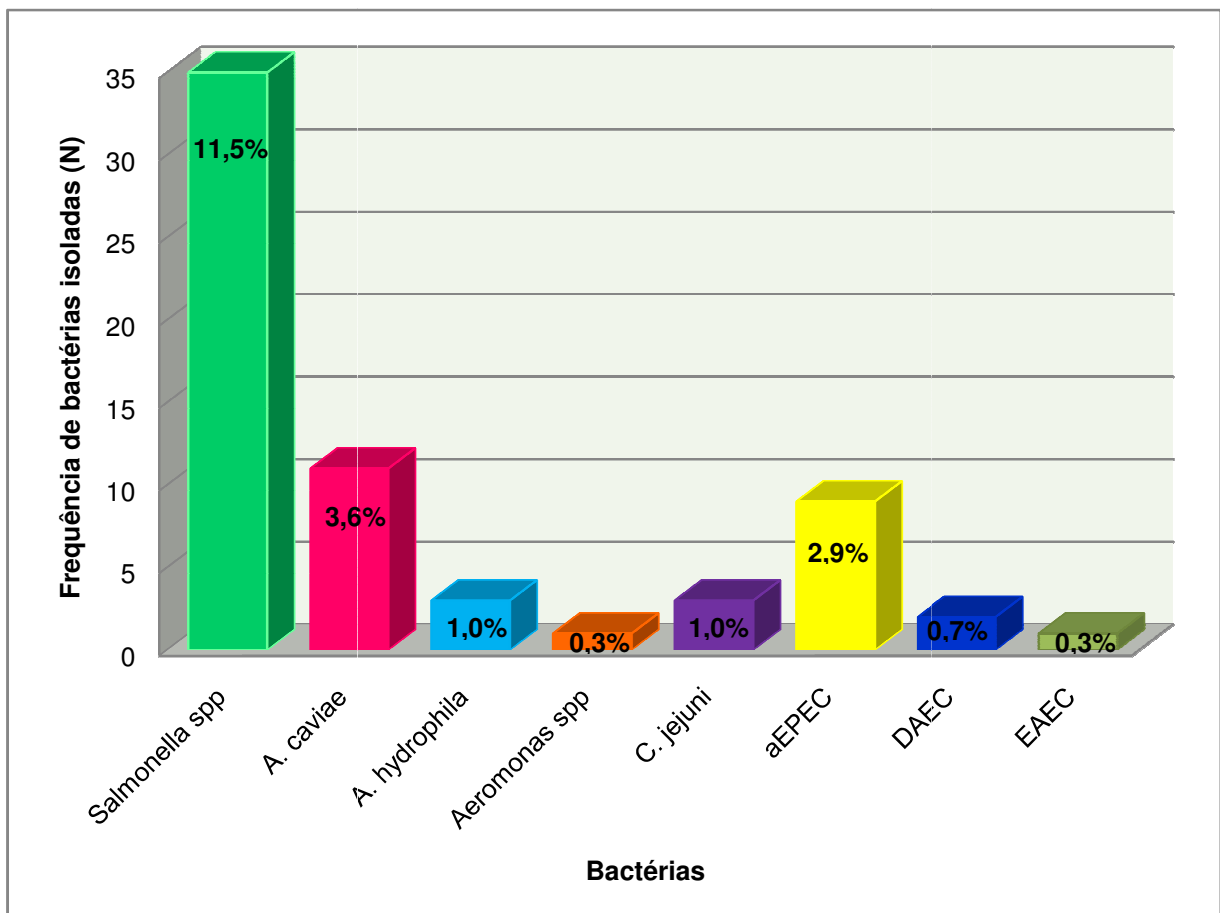
Em cada um dos sistemas de PCR está incluído um par de primers para a amplificação do gene *16S* como um controle interno da reação. Isso valida as reações negativas uma vez que a amplificação do gene *16S* mostra que não existe inibidores na reação de PCR.

## 5.2 FREQUÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS

Dos 305 espécimes fecais provenientes do LACEN/PR, 61 (20%) apresentaram um ou mais enteropatógenos bacterianos. Em 4 amostras foram recuperadas 2 bactérias, sendo *Salmonella* spp isolada de todas elas associada com aEPEC, DAEC, *A. caviae* ou *Aeromonas* spp.

Um total de 65 bactérias foram isoladas, e sua classificação e respectivas frequências estão indicadas no gráfico 1.

GRÁFICO 1 - FREQUÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS A PARTIR DE AMOSTRAS PROVENIENTES DO LACEN/PR

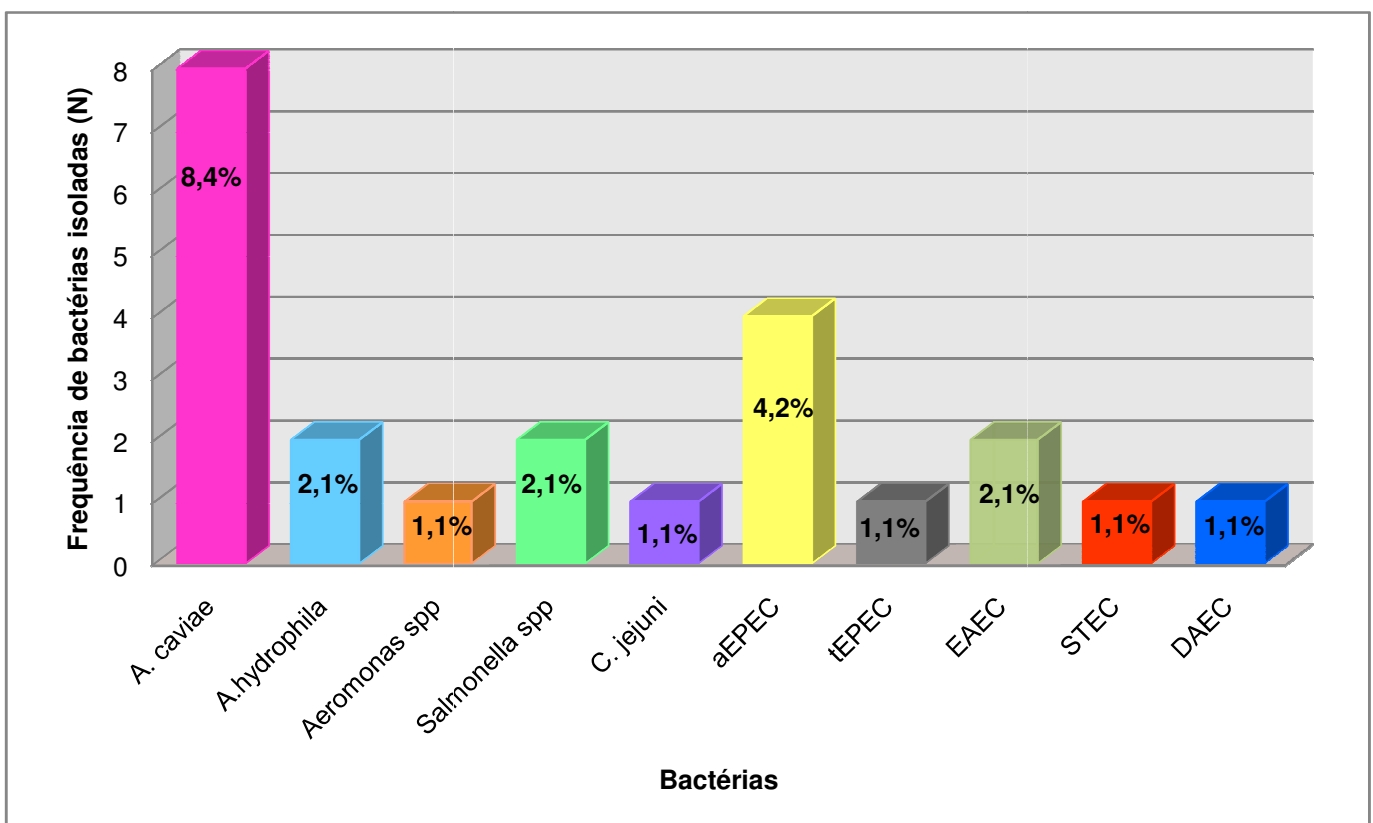


Estes resultados mostram que *Salmonella* spp foi o enteropatógeno mais frequente (11,5%) nas amostras provenientes do LACEN. Bactérias do gênero

*Aeromonas* foram isoladas em 4,9% das amostras e *A. caviae* (3,6%) foi a espécie prevalente. Estirpes de DEC foram isoladas de 3,9% das amostras, sendo aEPEC (2,9%) a mais frequente. *C. jejuni* foi recuperado de 1% das amostras.

Das 95 amostras diarreicas provenientes do Laboratório Municipal de Curitiba (LMC), 22 (23%) foram positivas para bactérias enteropatogênicas. Duas bactérias patogênicas foram isoladas de uma das amostras, *A. hydrophila* e aEPEC. No total 23 enteropatógenos foram isolados e sua identidade e respectiva frequência estão indicados no gráfico 2.

GRÁFICO 2 - FREQUÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DO LMC



O enteropatógeno prevalente nas amostras do LMC foi *Aeromonas* (11,6%), sendo *A. caviae* (8,4%) a mais comum. A frequência de DEC foi 9,5% e aEPEC (4,2%) foi a mais comum entre este grupo de bactérias. *Salmonella spp* foi isolada de 2,1% das amostras e *C. jejuni* de 1,1%.

Não houve diferença na frequência de exames positivos para os enteropatógenos pesquisados entre as amostras do LACEN e do LMC ( $p = 0,57$ ).

A frequência dos enteropatógenos nas amostras provenientes dos dois laboratórios foi comparada e os resultados estão indicados na Tabela 3

TABELA 3- FREQUÊNCIA DOS ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS A PARTIR DE AMOSTRAS DO LACEN E LMC.

<b>Bactéria</b>	<b>LACEN</b>	<b>LMC</b>	<b>p</b>
<i>Salmonella</i> spp	35	02	0,0066*
<i>Aeromonas caviae</i>	11	08	0,263
<i>Aeromonas hydrophila</i>	03	02	0,6108
<i>Aeromonas</i> spp	01	01	0,4703
aEPEC	09	04	0,7443
DAEC	02	01	1,00
EAEC	01	02	0,187
STEC	0	01	0,2738
tEPEC	0	01	0,2738
<i>Campylobacter jejuni</i>	03	01	1,00
Positivos	61	22	0,5765
Total de amostras	305	95	-

p, probabilidade com o teste exato de Fisher bidirecional; \* indica diferença estatisticamente significativa.

Esses resultados indicam que apenas a frequência de *Salmonella* difere entre as amostras do LACEN e LMC.

As tabelas 4 e 5 contém dados referentes às pessoas/amostras das quais foram isoladas bactérias enteropatogênicas

TABELA 4- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES DOS QUAIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LACEN/PR (CONTINUA).

<b>Número da amostra</b>	<b>Bactéria Isolada</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b> (em anos)	<b>Procedência da amostra</b>	<b>Data da Coleta</b>
116-C	<i>Salmonella</i> spp	♀	23	10 <sup>a</sup> RS Cascavel	10/06/2010
117-C	<i>Salmonella</i> spp	♂	25	10 <sup>a</sup> RS Cascavel	10/06/2010
214-C	<i>Salmonella</i> spp	♀	31	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	09/11/2010
215-C	<i>Salmonella</i> spp	♂	6	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	09/11/2010
216-C	<i>Salmonella</i> spp	♂	11	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	09/11/2010
219-C	<i>Salmonella</i> spp	♀	51	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	09/11/2010
241-C	<i>Salmonella</i> spp	♂	67	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	23/11/2010
242-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	48	5 <sup>a</sup> RS Paranaguá	24/11/2010
248-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	26	5 <sup>a</sup> RS Paranaguá	24/11/2010
252-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♀	50	10 <sup>a</sup> RS Cascavel	02/12/2010
258-C	aEPEC	♀	16	17 <sup>a</sup> RS Londrina	20/12/2010
259-C	aEPEC	♀	8	9 <sup>a</sup> RS Foz do Iguaçu	20/12/2010
02-C	aEPEC	♀	31	9 <sup>a</sup> RS Foz do Iguaçu	05/01/2011

NOTA: ♀: sexo masculino. ♂: sexo feminino. RS: regional de saúde.

TABELA 4- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES DOS QUAIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LACEN/PR (CONTINUA).

<b>Número da amostra</b>	<b>Bactéria Isolada</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b> (em anos)	<b>Procedência da amostra</b>	<b>Data da Coleta</b>
19-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	7	8ª RS F. Beltrão	13/01/2011
28-C	aEPEC	♂	7	5ª RS Paranaguá	20/01/2011
30-C	<i>Campylobacter jejuni</i>	♀	20	5ª RS Paranaguá	19/01/2011
34-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	36	2ª RS Curitiba	19/01/2011
35-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	9	2ª RS Curitiba	19/01/2011
51-C	aEPEC	♀	51	10ª RS Cascavel	02/01/2011
62-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	67	2ª RS Curitiba	04/02/2011
66-C	<i>Aeromonas hydrophila</i>	♂	20	2ª RS Curitiba	10/02/2011
81-C	<i>Campylobacter jejuni</i>	♂	22	1ª RS Antonina	18/02/2011
92-C	<i>Aeromonas hydrophila</i>	♀	47	2ª RS Curitiba	11/02/2011
93-C	<i>Aeromonas hydrophila</i>	♀	5	15ª RS Maringá	23/02/2011
96-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♀	71	5ª RS Paranaguá	18/02/2011
97-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	47	5ª RS Paranaguá	16/03/2011

NOTA: ♀: sexo masculino. ♂: sexo feminino. RS: regional de saúde.

TABELA 4- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES DOS QUAIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LACEN/PR (CONTINUA).

<b>Número da amostra</b>	<b>Bactéria Isolada</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b> (em anos)	<b>Procedência da amostra</b>	<b>Data da Coleta</b>
100-C	aEPEC	♂	6	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	24/03/2011
120-C	aEPEC	♂	0	14 <sup>a</sup> RS Paranavaí	20/05/2011
121-C	aEPEC	♂	16	14 <sup>a</sup> RS Paranavaí	20/05/2011
130-C	EAEC	♀	1	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	20/06/2011
134-C	<i>Salmonella spp</i> ; aEPEC	♀	67	8 <sup>a</sup> RS Cruzeiro	15/07/2011
135-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	28	8 <sup>a</sup> RS Cruzeiro	15/07/2011
136-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	39	8 <sup>a</sup> RS Cruzeiro	15/07/2011
137-C	<i>Salmonella spp</i> ; DAEC	♀	56	8 <sup>a</sup> RS Cruzeiro	15/07/2011
143-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♀	9	14 <sup>a</sup> RS Paranavaí	10/08/2011
154-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	1	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	19/08/2011
162-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	60	14 <sup>a</sup> RS Paranavaí	30/08/2011
184-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♀	1	18 <sup>a</sup> RS Guarapuava	29/09/2011
191-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	1	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	06/10/2011

NOTA: ♀: sexo masculino. ♂: sexo feminino. RS: regional de saúde. UMS: unidade municipal de saúde



TABELA 4- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES DOS QUAIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LACEN/PR (CONTINUA).

<b>Número da amostra</b>	<b>Bactéria Isolada</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b> (em anos)	<b>Procedência da amostra</b>	<b>Data da Coleta</b>
210-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	30	9 <sup>a</sup> RS Foz do Iguaçu	20/10/2011
214*-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	28	10 <sup>a</sup> RS Três Barras	16/10/2011
215*-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	14	10 <sup>a</sup> RS Três Barras	16/10/2011
216*-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	9	10 <sup>a</sup> RS Três Barras	17/10/2011
217-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	16	10 <sup>a</sup> RS Três Barras	17/10/2011
218-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	25	10 <sup>a</sup> RS Três Barras	17/10/2011
219*-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	1	10 <sup>a</sup> RS Três Barras	17/10/2011
221-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	35	10 <sup>a</sup> RS Três Barras	17/10/2011
225-C	DAEC	♀	51	1 <sup>a</sup> RS Guaraqueçaba	24/10/2011
227-C	<i>Aeromonas caviae</i>	♀	1	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	26/10/2011
232-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	53	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	11/11/2011
239-C	<i>Campylobacter jejuni</i>	♂	2	14 <sup>a</sup> RS Paranavaí	22/11/2011
246-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	1	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	30/11/2011

NOTA: ♀: sexo masculino. ♂: sexo feminino. RS: regional de saúde.

TABELA 4- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES DOS QUAIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LACEN/PR (CONCLUSÃO).

<b>Número da amostra</b>	<b>Bactéria Isolada</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b> (em anos)	<b>Procedência da amostra</b>	<b>Data da Coleta</b>
247-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	1	2 <sup>a</sup> RS Curitiba	08/12/2011
248-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	25	10 <sup>a</sup> RS Guaraniaçú	08/12/2011
249-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	38	10 <sup>a</sup> RS Guaraniaçú	08/12/2011
250-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	52	10 <sup>a</sup> RS Guaraniaçú	08/12/2011
251-C	<i>Salmonella spp; A.caviae</i>	♂	40	10 <sup>a</sup> RS Guaraniaçú	06/12/2011
252-C	<i>Salmonella spp</i>	♂	18	10 <sup>a</sup> RS Guaraniaçú	06/12/2011
01-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	9	10 <sup>a</sup> RS Cascavel	05/01/2012
02-C	<i>Salmonella spp</i>	♀	31	10 <sup>a</sup> RS Cascavel	05/01/2012
03-C	<i>Salmonella spp; Aeromonas spp</i>	♀	25	10 <sup>a</sup> RS Cascavel	05/01/2012

NOTA: ♀: sexo masculino. ♂: sexo feminino. RS: regional de saúde.

TABELA 5- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS PESSOAS DAS QUAIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LMC (CONTINUA)

Número da amostra	Bactéria Isolada	Sexo	Idade (em anos)	Dados Clínicos do paciente	Procedência da amostra	Data da coleta
2-lm	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	2	Parasitológico de fezes: Negativo Avaliação de rotina	Unidade de Saúde Parolin	02/12/2010
5-lm	<i>A. hydrophila</i> ; aEPEC	♂	9m	Coprocultura: EPEC Risco evolutivo-sócio econômico Diarréia intermitente	Unidade de Saúde São Domingos	03/12/2010
7-lm	STEC	♀	57	Parasitológico de fezes: Negativo Avaliação complementar Chagas e menopausa	Unidade de Saúde Nova Orleans	15/12/2010
11-lm	aEPEC	♂	11m	Parasitológico de fezes: Negativo Risco evolutivo social Constipação crônica	Unidade de Saúde São Domingos	08/02/2011
15-lm	tEPEC	♀	22	Parasitológico de fezes: Negativo Sangue oculto:+++ Febre crônica, poliartrite e diarréia	Unidade de Saúde Umbará	28/01/2011
23-lm	EAEC	♂	47	Sangue oculto: +++++	Unidade de Saúde Santa Cândida	23/03/2011
27-lm	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	♂	2m	Anemia Avaliação geral da criança, risco evolutivo sócio-econômico	Unidade de Saúde São Domingos	04/04/2011

NOTA: ♀: sexo masculino. ♂: sexo feminino. NI\*: dados não informados

TABELA 5- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS PESSOAS DAS QUAIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LMC (CONTINUA)

Número da amostra	Bactéria Isolada	Sexo	Idade (em anos)	Dados Clínicos do paciente	Procedência da amostra	Data da coleta
34-lm	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	8	Parasitológico de fezes: Negativo Dor abdominal Sangue oculto: +++	Unidade de Saúde São Domingos	25/04/2011
35-lm	aEPEC	♂	1	Parasitológico de fezes: <i>Ascaris lumbricoides</i> e <i>Giardia lamblia</i> Diarréia recorrente	Unidade de Saúde Fernando de Noronha	08/04/2011
38-lm	aEPEC	♂	3	Parasitológico de fezes: Negativo Diarréia a 30 dias Leuc fezes:	Unidade de Saúde Barigúí	12/07/2011
41-lm	EAEC	♀	1	Parasitológico de fezes: Negativo Assaduras recorrentes	Unidade de Saúde São Domingo	27/09/2011
57-lm	DAEC	♂	30	Sangue oculto: +++ Fezes com sangue por 2 anos	Unidade de Saúde Bairro Alto	16/08/2011
60-lm	<i>Salmonella spp</i>	♀	79	NI*	Unidade de Saúde Waldemar Monastie	01/09/2011
68-lm	<i>Aeromonas spp</i>	♂	1	NI*	Unidade de Saúde São Domingos	02/08/2011

NOTA: ♀: sexo masculino. ♂: sexo feminino. NI\*: dados não informados

TABELA 5- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS PESSOAS DAS QUAIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LMC (CONTINUA)

<b>Número da amostra</b>	<b>Bactéria Isolada</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (em anos)</b>	<b>Dados Clínicos do paciente</b>	<b>Procedência da amostra</b>	<b>Data da coleta</b>
69-lm	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	1	Parasitológico de fezes: Negativo Diarréia e queda ponderal	Unidade de Saúde N.Sª do Sagrado coração	29/07/2011
71-lm	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	81	Diarréia crônica Acompanhamento oncológico	Unidade de Saúde Tinguí	10/10/2011
75-lm	<i>Salmonella spp</i>	♂	12	NI*	Unidade de Saúde Santa Cândida	24/09/2011
77-lm	<i>Aeromonas caviae</i>	♀	12	Parasitológico de fezes: Negativo Dor abdominal	Unidade de Saúde Bairro Alto	18/10/2011
82-lm	<i>Aeromonas caviae</i>	♀	45	Exame de rotina	Unidade de Saúde Pilarzinho	04/10/2011
85-lm	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	2	Dor abdominal	Unidade de Saúde Santa Cândida	23/09/2011
86-lm	<i>Aeromonas caviae</i>	♂	30	Diarréia persistente	Unidade de Saúde Pilarzinho	04/10/2011

NOTA: ♀= sexo masculino. ♂= sexo feminino. NI\*: dados não informados

TABELA 5- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS PESSOAS DAS QUAIS FORAM ISOLADAS BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS - AMOSTRAS PROVENIENTES DO LMC (CONTINUA)

<b>Número da amostra</b>	<b>Bactéria Isolada</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (em anos)</b>	<b>Dados Clínicos do paciente</b>	<b>Procedência da amostra</b>	<b>Data da coleta</b>
94-Im	<i>Campylobacter jejuni</i>	♀	32	Parasitológico de fezes: Negativo Sangue oculto +++	Unidade de Saúde Bacacheri	27/10/2011

NOTA: ♀: sexo masculino. ♂: sexo feminino. NI\*: dados não informados

O LACEN realiza culturas de amostras fecais obtidas de casos isolados e surtos de diarreia. No caso de análise de surtos de diarreia geralmente são encaminhadas amostras fecais de cerca de 10% das pessoas afetadas pela doença. A tabela 4 mostra informações referentes à idade, sexo, região geográfica onde mora o doente e a data da coleta das amostras encaminhadas ao LACEN. Estes dados aliados à identidade do enteropatógeno permitem sugerir a ocorrência de surtos de doença diarreica.

Os dados sugerem que durante o período de 10/06/2010 a 05/01/2012 podem ter ocorrido surtos provocados por *Salmonella* nas cidades de Cascavel (junho/2010 e janeiro/2012), Curitiba (novembro/2010, janeiro-fevereiro/2011), Cruzeiro (julho/2011), Três Barras (outubro/2011) e Guaraniaçu (dezembro/2011).

Apenas com essas informações também não se pode descartar a ocorrência de possíveis surtos causados por *A. caviae* em Paranaguá (novembro/ 2010) e por aEPEC em Paranaíba (maio/2011).

A tabela 5 traz informações sobre as pessoas atendidas pelo LMC, que trabalha com amostras encaminhadas pelos Postos de Saúde e que provavelmente representam casos isolados de diarreia.

A tabela 6 indica o número de cada tipo de bactéria recuperado das amostras fecais de acordo com a idade dos doentes.

TABELA 6- COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ENTEROPATÓGENOS POR GRUPO DE FAIXAS ETÁRIAS

<b>Bactérias</b>	<b>0-5 anos</b>	<b>6-15 anos</b>	<b>&gt;15 anos</b>	<b>p-total</b>
<i>Salmonella</i>	4	8	25	0,022*
<i>Aeromonas</i>	10	3	13	0,186
<i>Campylobacter</i>	1	0	3	1,0
DEC	7	3	11	0,603

Foi utilizado o teste exato com a tabela de contingência  $r \times c$ ; \*indica uma diferença estatisticamente significativa.

Os dados apresentados na Tabela 6 indicam que todos os enteropatógenos isolados, considerando *Aeromonas* como um único grupo, e o mesmo para as *E. coli* diarreogênicas, foram isolados de pessoas de todas as faixas etárias.

A frequência de *Salmonella* é significativamente menor em cerca de 2,5 vezes entre crianças na faixa etária de 0-5anos (18%) quando comparada com as faixas etárias de 6-15 anos (57%) e >15anos (48%). Para as demais bactérias não houve diferenças significativas nas frequências em relação às três faixas etárias analisadas.

### 5.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados é mostrado nas tabelas 7, 8, 9 e 10.



TABELA 7- PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *AEROMONAS* (CONTINUA)

Estirpe	Antimicrobiano																
	CAZ	CFO	SUT	CTX	COM	AMC	CRO	TE	CIP	AK	MER	C	IPM	LVX	ATM	AMP	NA
2-Im	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	S	S	S	S	R	R
5 Im	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
27 Im	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
34 Im	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
68 Im	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
69 Im	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
71 Im	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
77 Im	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82 Im	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
85 Im	S	S	I	S	S	S	ND	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
86 Im	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
66-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
92-C	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
93-C	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
96-C	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
97-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
143-C	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
242-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
248-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
252-C	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S

CAZ – ceftazidime; CFO – cefoxitina; SUT–sulfametaxazol/ trimetropim; CTX –cefotaxime; CPM – cefepime; AMC –amoxicilina/ác.clavulânico; CRO-ceftriaxona; TE-tetraciclina; CIP – ciprofloxacina;AK–amikacina; MER- meropenem; C- cloranfenicol; IPM–imipenem , LVX- levofloxacino; ATM–aztreonam; AMP–ampicilina; NA- ácido nalidíxico  
R – resistente; I – intermediário; S – sensível. ND- não definido

TABELA 7- PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *AEROMONAS* (CONCLUSÃO)

Estirpe	Antimicrobiano																
	CAZ	CFO	SUT	CTX	COM	AMC	CRO	TE	CIP	AK	MER	C	IPM	LVX	ATM	AMP	NA
162-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
219-C	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	I	S	S	R	S
227-C	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
251-C	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
03-C	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	R	S

CAZ – ceftazidime; CFO – cefoxitina; SUT–sulfametaxazol/ trimetropim; CTX –cefotaxime; CPM – cefepime; AMC –amoxicilina/ác.clavulânico; CRO-ceftriaxona; TE-tetraciclina; CIP – ciprofloxacina;AK–amikacina; MER- meropenem; C- cloranfenicol; IPM–imipenem , LVX- levofloxacino; ATM–aztreonam; AMP–ampicilina; NA- ácido nalidíxico  
R – resistente; I – intermediário; S – sensível. ND- não definido

Apenas uma estirpe de *Aeromonas* foi suscetível a todos os antimicrobianos testados. A resistência mais comum foi à ampicilina. Onze padrões diferentes de resistência aos antimicrobianos foram observados entre estas bactérias. Duas estirpes multi-resistentes (143-C, 219-C) foram encontradas entre *A. caviae*

TABELA 8- PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *SALMONELLA* (CONTINUA)

Estirpe	Antimicrobiano																
	NA	CAZ	AMP	SUT	ETP	ATM	CN	AMC	CRO	KF	TE	CIP	MER	C	IPM	LVX	CFO
60 Im	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
75-Im	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
116-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
117-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
214-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
215-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
216-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
219-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	S	S
241-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
34-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
62-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
134-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
135-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
136-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
137-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
154-C	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
191-C	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S

NA- ácido nalidíxico; CAZ - ceftazidime; AMP-ampicilina; SUT-sulfametaxazol/ trimetopim; ETP- ertapenem; ATM-aztreonam; CN- gentamicina; AMC -amoxicilina/ác.clavulânico; CRO-ceftriaxona; KF-cefalotina; TE - tetraciclina; CIP - ciprofloxacina; MER- meropenem; C- cloranfenicol; IPM-imipenem , LVX- levofloxacino; CFO - cefoxitina. R - resistente; I - intermediário; S - sensível. ND-não determinado

TABELA 8- PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *SALMONELLA* (CONCLUSÃO)

Estirpe	Antimicrobiano																
	NA	CAZ	AMP	SUT	ETP	ATM	CN	AMC	CRO	KF	TE	CIP	MER	C	IPM	LVX	CFO
210-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
214*-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
215*-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
216*-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
217-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
218-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
221-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
232-C	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
246-C	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
247-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
248-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
249-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
250-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
251-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
252-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
01-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
02-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
03-C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

NA- ácido nalidíxico; CAZ – ceftazidime; AMP–ampicilina; SUT–sulfametaxazol/ trimetropim; ETP– ertapenem; ATM–aztreonam; CN– gentamicina; AMC –amoxicilina/ác.clavulânico; CRO-ceftriaxona; KF-cefalotina; TE – tetraciclina; CIP – ciprofloxacina; MER- meropenem; C- cloranfenicol; IPM–imipenem , LVX- levofloxacino; CFO – cefoxitina. R – resistente; I – intermediário; S – sensível. ND-não determinado

Todas as *Salmonella* foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Trinta e uma estirpes (83,8%) foram resistentes ao ácido nalidíxico. À tetraciclina, cinco estirpes (13,5%) foram resistentes e ao cloranfenicol 4 estirpes (10,8%). Três estirpes (8,1%) foram resistentes à ampicilina, duas (5,4%) à cefalotina e três (8,1%) ao sulfametoxazol/trimetoprim. Quatro estirpes de *Salmonella* (60-Im, 154-C, 191-C e 232-C) apresentaram resistência a múltiplos antimicrobianos.

TABELA 9- PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *E.coli* DIARREOGÊNICAS (CONTINUA)

Amostra	Antimicrobiano														
	CAZ	CFO	AMP	KF	CIP	CRO	CPM	ATM	SUT	IPM	TZP	AMC	CTX	CN	TE
5 lm	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7 lm	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11 lm	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15 lm	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23 lm	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35 lm	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
38 lm	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
41 lm	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
57 lm	S	S	R	S	S	S	ND	S	S	S	S	S	S	S	S
02-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
51-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
100-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
120-C	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
121-C	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
130-C	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
134-C	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
137-C	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

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

TABELA 9- PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *E.coli* DIARREOGÊNICAS (CONCLUSÃO)

Amostra	Antimicrobiano														
	CAZ	CFO	AMP	KF	CIP	CRO	CPM	ATM	SUT	IPM	TZP	AMC	CTX	CN	TE
225-C	S	S	R	S	S	S	ND	S	S	S	S	S	S	S	S
258-C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
259-C	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

CAZ – ceftazidime; CFO – cefoxitina; AMP–ampicilina; KF–cefalotina; CIP – ciprofloxacina; CRO – ceftriaxona; CPM – cefepime; ATM–aztreonam; SUT–sulfametaxazol/ trimetropim; IPM–imipenem; TZP – piperacilina/tazobactam; AMC – amoxicilina/ác.clavulânico; CTX –cefotaxime; CN – gentamicina; TE – tetraciclina. R – resistente; I – intermediário; S – sensível. ND-não determinado

Das 21 *E.coli* diarreogênicas analisadas, 10 (47,6%) foram susceptíveis a todas as drogas testadas e incluem aEPEC (8), STEC (1) e tEPEC (1). Foi verificada a resistência a somente 2 dos 15 antimicrobianos testados. A resistência observada com maior frequência foi à ampicilina (11 estirpes). Apenas 1 estirpe foi resistente à cefalotina.

TABELA 10- PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *CAMPYLOBACTER*

Amostra	Antimicrobiano		
	TE	EM	CIP
94-Im	R	S	R
30-C	S	S	R
81-C	S	S	S
239-C	S	S	R

TE- tetraciclina; EM-eritromicina; CIP: ciprofloxacina

Apenas uma estirpe de *C. jejuni* foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Estes dados mostram que é importante que o teste de sensibilidade aos antimicrobianos seja realizado rotineiramente para esta bactéria.



## 6 DISCUSSÃO

Gastroenterite é uma causa comum de internações hospitalares e mortes de crianças principalmente durante os primeiros anos de vida (UNICEF/WHO, 2009; WIEGERING *et al.*, 2011).

O saneamento básico, acesso a água tratada, melhoria na higiene pessoal e cuidados no preparo de alimentos são fatores que reduzem o índice dessas doenças. Esses fatores associados ao diagnóstico laboratorial das doenças diarreicas, que permite a identificação do enteropatógeno causador da infecção, direciona para o correto tratamento e eventualmente permite identificar a fonte de contaminação que são fundamentais para o controle dessas doenças.

Para que o diagnóstico laboratorial seja abrangente é preciso conhecer os principais enteropatógenos associados com a doença no país e nas diferentes regiões do mesmo. Um dos objetivos desse trabalho foi determinar a frequência de enteropatógenos bacterianos no Paraná, em pessoas de todas as faixas etárias, visando contribuir para o esclarecimento da etiologia dessas doenças e verificar a importância das DEC nesta região.

No cômputo geral, considerando os dados do LACEN e LMC em conjunto, o índice de positividade para enteropatógenos bacterianos foi de 20,7%, similar ao relatado em estudo realizado em Juruti (Pará) que também envolveu crianças e adultos com 19% (LOUREIRO *et al.*, 2010). As bactérias isoladas e as respectivas frequências estão indicadas a seguir: *Salmonella* spp (9,2%), *Aeromonas* spp (6,5%), estirpes de *E. coli* diarreogênicas (5,2%) e *Campylobacter* (1%). Nas amostras analisadas não foram detectados casos de diarreia associados com *Shigella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp, *Plesiomonas shigelloides*, EIEC e ETEC.

Considerando isoladamente as amostras do LACEN e do LMC, os índices de positividade para bactérias enteropatógenas foram respectivamente de 20% e 23%. Não houve diferença significativa ( $p = 0,5765$ , Tabela 3) no índice de positividade entre as duas populações atendidas por esses laboratórios.

Em relação aos enteropatógenos isolados de cada amostra, foi verificada uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0066$ ) na frequência de *Salmonella* spp. As frequências observadas foram de 11,5% nas amostras do

LACEN e de 2,1% nas do LMC (Tabela 3). Este dado sugere que *Salmonella* spp é o agente prevalente em casos de surtos de diarreia, que são as amostras prevalentemente analisadas pelo LACEN, mas tem menor participação nos casos esporádicos de diarreia na população atendida pelo LMC.

A tabela 6 mostra a frequência dos enteropatógenos de acordo com a idade dos doentes. Para *Aeromonas*, *Campylobacter* e DEC não houve diferença estatisticamente significativa em relação à prevalência dessas bactérias nas faixas etárias analisadas. No entanto, a frequência de *Salmonella* em crianças na faixa etária de 0-5anos foi significativamente menor ( $p= 0,022$ ) quando comparada às demais, nas quais houve predomínio de *Salmonella*. No grupo de crianças entre 0-5 anos *Aeromonas* e DEC foram as bactérias predominantes (Tabela 6).

Oito prováveis surtos causados por *Salmonella* ocorreram (Cascavel, 06/2010 e 01/2012; Curitiba, 01-02/2011 e 11/2010, Cruzeiro 07/2011; Guaraniaçu 12/2011; Três Barras 10/2011) no Estado conforme dados mostrados na Tabela 4 e os resultados do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (Tabela 8), que mostram que as estirpes isoladas em uma dada localidade e data apresentam o mesmo perfil de suscetibilidade.

Além desses, 2 outros prováveis surtos causados por *A. caviae* (Paranaguá, 11/2010), e aEPEC (Paranavaí, 05/2011) foram detectados. Há poucos estudos mostrando a participação de *Aeromonas* em surtos, um deles ocorrido no Brasil e bem documentado (HOFER *et al.*, 2006). Ao contrário, a participação de aEPEC em surtos de diarreia envolvendo adultos e crianças parece estar bem estabelecida (citado em KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

Os dados mostrados confirmam que *Salmonella* é o principal agente bacteriano associado com surtos no Paraná, como é indicado pelo informe SE012012 da Secretaria de Saúde no Estado, disponível em (<http://www.sesa.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2811>).

A infecção por *Salmonella* em humanos e animais continua a ser um problema de saúde pública preocupante em todo o mundo (CHIU, SU e CHU, 2005; PUPPULIN *et al.*, 2009; WIEGERING *et al.*, 2011).

Espécies de *Salmonella* estão entre os patógenos mais importantes transmitidos por alimentos, levando a milhões de casos de diarreia e surtos no mundo todo, sendo *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis a principal estirpe isolada atualmente (O'BRIEN *et al.*, 2002; GALANIS *et al.*, 2006; MÜRMAN *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; ZWEIFEL e STEPHAN, 2011). *Salmonella* spp foi a bactéria predominante (11,5%) nas fezes diarreicas provenientes do LACEN, comprovando a sua relevante participação em surtos de diarreia (Tabela 4).

Além disso, a importância dessa bactéria em casos esporádicos de diarreia também pode ser verificada (Tabelas 4 e 5). Entre quatro casos de infecções mistas *Salmonella* spp foi isolada de todas elas associada com aEPEC, DAEC, *A. caviae* ou *Aeromonas* spp. A associação de *Salmonella* com *Aeromonas* e *E.coli* foi também reportada por GUERRA e colaboradores (2007).

Todas as estirpes de *Salmonella* foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Trinta e uma estirpes (83,8%) foram resistentes ao ácido nalidíxico. Quatro estirpes (10,8%) foram resistentes ao cloranfenicol, à ampicilina e ao sulfametoxazol/trimetoprim. Cinco estirpes (13,5%) foram resistentes à tetraciclina. MARAGKOUidakis e colaboradores (2011) observaram a emergência da resistência à ampicilina, cloranfenicol e ácido nalidíxico em estirpes de *Salmonella* isoladas no período de 2007-2010 na Grécia. Este padrão de resistência é similar aos resultados observados nas estirpes analisadas no presente trabalho. Em estudo realizado em Salvador (BA) DINIZ-SANTOS e colaboradores (2005), mostraram que estirpes de *Salmonella* isoladas de crianças com diarreia, apresentaram resistência aos antimicrobianos ampicilina (4%), ciprofloxacina (2%) e sulfametoxazol/ trimetoprim (2%). Não foi observada resistência à ciprofloxacina entre as estirpes isoladas no presente trabalho. E para ampicilina e sulfametoxazol/ trimetoprim os índices foram de 8%, superiores aos observados nas estirpes isoladas por DINIZ-SANTOS colaboradores (2005), sugerindo que há diferenças no perfil de resistência em isolados de *Salmonella* em diferentes regiões geográficas.

Quatro estirpes de *Salmonella* apresentaram resistência à 3 ou mais antimicrobianos de classes distintas (multi-resistência) incluindo ácido nalidíxico (quinolona), ampicilina (penicilina), sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina, cefalotina (cefalosporina) e cloranfenicol (fenicol) (Tabela 8).

Enquanto bactérias do gênero *Salmonella* predominam nas amostras do LACEN com 11,5% de frequência, as do gênero *Aeromonas* predominam nas do LMC com 11,6%, com destaque para *Aeromonas caviae* (8,4%) (Gráficos 1 e 2; Tabela 3).

As *Aeromonas* não são pesquisadas na rotina dos laboratórios em geral e são poucos os dados sobre a frequência destes enteropatógenos no Brasil. Das *Aeromonas* isoladas nas amostras do LMC (11,6%), 8,4% é representado por *A. caviae*, 2,1% por *A. hydrophila* e 1,1% por *Aeromonas* spp. Nas amostras do LACEN, *Aeromonas* foram isoladas numa frequência de 4,9%, sendo 3,6% de *A. caviae*, 1,0% de *A. hydrophila* e 0,3% de *Aeromonas* spp. Trabalhos publicados no Brasil mostram que a frequência de *Aeromonas* varia entre 2,2% a 20% (HOFER *et al.*, 2006; GUERRA *et al.*, 2007; LOUREIRO *et al.*, 2010; SUREK *et al.*, 2010). As frequências encontradas no presente trabalho estão dentro deste intervalo.

O predomínio de *A. caviae* nas infecções intestinais humanas associadas à *Aeromonas* também foi observado em outros estudos realizados no Paraná e Pernambuco (HOFER *et al.*, 2006; SUREK, 2010).

No Rio Grande do Sul, GUERRA e colaboradores (2007) detectaram 6,6% de *Aeromonas* em pacientes internados devido à diarreia, sendo *A. hydrophila* a mais comum (52%) seguida de *A. caviae* (41%).

LOUREIRO e colaboradores (2010), com o intuito de determinar a frequência de bactérias enteropatogênicas em pacientes com diarreia aguda no Pará, isolaram 2,2% de *Aeromonas*, sendo 1,1% de *A. hydrophila* e 1,1% *A. sobria*. Estes dados sugerem que a incidência desses patógenos pode variar de acordo com a região geográfica.

No Paraná, a frequência de *Aeromonas* em fezes diarreicas foi de 2,6% em estudo realizado por SUREK e colaboradores (2010). *A. caviae* (63,1%) foi a espécie predominante, mas também foram isoladas *A. hydrophila* (10,5%) e *A. veronii* biovar *sobria* (5,3%). No presente trabalho o índice de amostras positivas para *Aeromonas* foi de 6,5%, superior ao relatado por SUREK e colaboradores (2010). Esta diferença pode ser devida às características da amostra, que no caso de SUREK e colaboradores (2010) foi composta por amostras diarreicas encaminhadas para coprocultura em um laboratório de análises clínicas que atende predominantemente

população de classe médio-alta de Curitiba. No presente estudo foram selecionadas pessoas com diarreia e as amostras encaminhadas pela Vigilância Sanitária, ou pelo Sistema Único de Saúde. Os dados obtidos também confirmam o predomínio de *A. caviae* que corresponde a 73% das *Aeromonas* isoladas.

Um caso de infecção mista envolvendo *A. hydrophila* e aEPEC também foi detectado (tabela 5) em uma amostra do LMC, infecção mista envolvendo *A. caviae* e *Salmonella* foi relatada por HOFER e colaboradores (2004).

O único surto de diarreia documentado no país associado a *Aeromonas* ocorreu em 2004 no estado de Pernambuco. *Aeromonas* foram isoladas de 20% das amostras em contraste com 5% associados com as etiologias clássicas (*V. cholerae* O1, *Salmonella*, *Shigella*, incluindo *V. cholerae* não O1/ não O139) (HOFER, *et al.*, 2006).

Embora poucas informações sobre a incidência de diarreia por *Aeromonas* no país estejam disponíveis, estes relatos mostram o potencial dessas bactérias para causar surtos e casos esporádicos de diarreia e a sua importância como agente etiológico da doença no país.

Quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados, apenas uma estirpe de *Aeromonas* foi suscetível a todos os antimicrobianos testados. A resistência mais comum foi à ampicilina (96,1%). A maioria das espécies de *Aeromonas* possui resistência intrínseca à ampicilina (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003; CLSI, 2011) enquanto que as taxas de resistência aos outros antimicrobianos varia nos diferentes países (GHENGHESH *et al.*, 2008).

Uma estirpe de *A. caviae* foi suscetível à ampicilina, sendo que de acordo com ABBOTT, CHEUNG e JANDA (2003), bactérias dessa espécie são 100% resistentes a este antimicrobiano. Estas bactérias foram identificadas apenas através de testes bioquímicos. No entanto, a existência de estirpes de *Aeromonas* com perfis bioquímicos atípicos foi bem documentada por ABBOTT, CHEUNG e JANDA (2003). Por essa razão este isolado de *A. caviae* deve ser analisado através de outras metodologias como RFLP de 16S rRNA ou seqüenciamento dos genes *16S rRNA*, *gyrB* e *rpoD* para confirmar sua identificação (MARTINEZ-MURCIA *et al.*, 1992; FIGUERAS *et al.*, 2000; SOLER *et al.*, 2004).

A resistência à amoxicilina/ácido clavulânico foi observada em 26,9% das estirpes e à cefoxitina em 23,1%. Para o sulfametoxazol/trimetoprim foi observada

resistência em 15,4% das estirpes. Além disso, também foi observada resistência à tetraciclina (7,7%). Duas estirpes de *A. caviae* apresentaram multi-resistência incluindo ampicilina (penicilina), ácido nalidíxico (quinolona), sulfametoxazol/trimetoprim e ampicilina, cefoxitina (cefalosporina), sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina (Tabela 7). SUREK e colaboradores (2010) também relataram resistência a esses antimicrobianos entre as estirpes isoladas, bem como estirpes multi-resistentes. Elevados índices de resistência de *Aeromonas* aos antimicrobianos também foram relatados por GUERRA e colaboradores (2007). Esses dados mostram a importância de se realizar o antibiograma para isolados de *Aeromonas*, uma vez que com exceção da resistência intrínseca, não há um padrão de suscetibilidade previsível.

No total a frequência das DEC foi de 5,2%. O patótipo mais freqüente de DEC foi aEPEC (3,2%), seguida de EAEC e DAEC (0,75%). STEC e EPEC foram encontradas com frequência de 0,25%. A estirpe de EPEC foi isolada de adulto (Tabela 5) e seu significado não é claro uma vez que a pesquisa desta bactéria é realizada apenas em crianças de até 2 anos de idade. Entretanto, o exame parasitológico deste doente foi negativo, e também não foram isoladas outras bactérias enteropatogênicas. Além disso, foi detectada presença de sangue oculto nas fezes.

A significância epidemiológica de cada categoria de *E.coli* diarreiogênica varia com a localização geográfica e estilo de vida das pessoas até mesmo dentro do próprio país (RODRIGUES *et al.*, 2004; SCALETSKY *et al.*, 2002a, 2002b; ZAMBONI *et al.*, 2004). ETEC e EAEC, por exemplo, são as principais causas de diarreia do viajante (DE LA CABADA BAUSHE e DuPONT, 2011), mas nesse estudo, nenhuma ETEC foi isolada e EAEC foi isolada numa frequência baixa (0,75%). Em contrapartida, outros autores no Brasil isolaram EAEC com frequências entre 5% a 25% e ETEC entre 1,3% a 10% (ORLANDI *et al.*, 2006; MORENO *et al.*, 2010; BUERIS *et al.*, 2007; GARCIA, SILVA e DINIZ, 2011). Isto sugere que estas estirpes de DEC não são predominantes em casos de diarreia no estado do Paraná.

As DAEC, bem como as EAEC, são consideradas patógenos emergentes (reconhecidos há pouco tempo). SPANO e colaboradores (2008) relataram no Brasil uma alta frequência de DAEC em crianças abaixo de um ano. No presente estudo a

baixa frequência detectada (0,75%) desse patógeno poderia ser explicada em parte pela inclusão de adultos e crianças na amostra analisada.

tEPEC foi o primeiro patótipo de DEC a ser descrito e associado com diarreia, e foi uma das principais causas de diarreia persistente em crianças de países em desenvolvimento. No entanto, na última década tem sido observada uma queda na frequência de casos de diarreia causados por tEPEC, o que foi acompanhado da emergência e número crescente de casos provocados pelas EPEC atípicas, tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (WILLIAMS, TORRES e LLOYD, 2010). Embora a frequência das DEC seja heterogênea nas diferentes regiões do país, as aEPEC estão entre as mais freqüentes. As estirpes de aEPEC foram prevalentes entre a DEC nas amostras analisadas em nosso trabalho, confirmando as taxas encontradas por outros autores no Brasil (ORLANDI *et al.*, 2006; BUERIS *et al.*, 2007; ARANDA *et al.* 2007; SPANO *et al.*, 2008; MORENO *et al.*, 2010; SCALETISKY *et al.*, 2010; GARCIA, SILVA e DINIZ, 2011).

Além disso, os dados sobre localidade e data de coleta das amostras (tabela 4) indicam que aEPEC pode estar relacionada a surtos na cidade de Paranavaí. Se confirmado através de outras análises epidemiológicas como a eletroforese em campo pulsado, este poderia ser o primeiro surto por aEPEC documentado no país. Esta bactéria já foi associada com vários surtos no exterior (citado em KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Este patótipo de DEC é considerado uma importante causa de diarreia no nosso país, o que também foi confirmado no Paraná.

Embora as estirpes de STEC não sejam umas das principais causas de diarreia, a morbidade e a mortalidade associadas aos surtos e casos esporádicos de doenças gastrointestinais causados por este patótipo, tornaram este microrganismo um problema mundial de saúde pública (PATON e PATON, 1998; WILLIAMS, TORRES e LLOYD, 2010). As infecções devido a STEC são relatadas em casos esporádicos de diarreia no Brasil.

A frequência relatada para STEC no país varia entre 0,5% a 7,4% de (GUTH *et al.*, 2002; VAZ *et al.*, 2004; CERGOLLE-NOVELLA *et al.*, 2006; ORLANDI *et al.*, 2006; IRINO *et al.*, 2007; BUERIS *et al.*, 2007; GARCIA, SILVA e DINIZ, 2011).

Aparentemente, há um único relato sobre a incidência de STEC em casos de diarreia no Paraná, indicando uma prevalência de 1,96%. Os isolados apresentaram

os perfis de virulência *stx1*, *eae* e *stx1* respectivamente (DE TONI *et al.*, 2009). Em nosso estudo, somente uma STEC (0,25%) foi identificada e em uma amostra proveniente do LMC. Foi determinado por PCR, que esta bactéria continha os genes de virulência *stx1 eae*, que aparentemente representa um genótipo de STEC comum no país (GUTH *et al.*, 2002; VAZ *et al.*, 2004; IRINO *et al.*, 2007; DE TONI *et al.*, 2009).

Nenhuma EIEC foi isolada nas amostras analisadas. Estudos relatam uma incidência muito baixa para este patotipo de DEC, sendo a maior ocorrência relacionada a surtos e entre crianças de países em desenvolvimento. Investigações realizadas no Brasil sobre enteropatógenos envolvidos com diarreia infantil também demonstraram baixa frequência de EIEC (FRANZOLINI *et al.*, 2005; MOYO *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2007; SPANO *et al.*, 2008; MORENO *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2011).

A importância das *E. coli* diarreogênicas já foi apresentada por vários autores no Brasil e no mundo (SCAVIA *et al.*, 2008; LOUREIRO *et al.*, 2010; RAJENDRAN *et al.*, 2010; BEHIRY *et al.*, 2011; GARCIA, SILVA e DINIZ, 2011) e a sua ocorrência no estado do Paraná, conforme consta nesse estudo, mostra sua ampla distribuição e importância como um problema de saúde pública.

Das 21 *E. coli* diarreogênicas isoladas 10 (47,6%) foram suscetíveis a todas as drogas testadas e incluem aEPEC (8), STEC (1) e tEPEC (1). Foi verificada a resistência a somente 2 dos 15 antimicrobianos testados. A resistência observada com maior frequência foi à ampicilina por 11 estirpes (52,4%), sendo 3 EAEC, 3 DAEC e 5 aEPEC. Apenas 1 estirpe (aEPEC) foi resistente à cefalotina (4,8%). Em estudo com aEPEC, ABE e colaboradores (2009) encontraram os maiores níveis de resistência entre ampicilina (31,9%), sulfametoxazol/trimetoprim (27,8%) e tetraciclina (36,1%), para cefalotina a taxa foi de 16,7%. GARCIA, SILVA e DINIZ (2011) relatam altos níveis de resistência à ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprim em DEC isoladas no Brasil, enquanto para a cefalotina o índice foi de 5,9%. AMAYA e colaboradores (2011) estudando isolados de DEC na Nicarágua observaram maiores níveis de resistência à ampicilina (60%) e sulfametoxazol/trimetoprim (64%). OCHOA e colaboradores (2009), no Perú observaram altos níveis de resistência à ampicilina (83%), sulfametoxazol/trimetoprim



(79%) e tetraciclina (65%). SOUZA e colaboradores (2009), no Brasil, relatam índices de resistência à ampicilina e tetraciclina, de 27% e 19% respectivamente. Estes dados indicam que a resistência à ampicilina é comum entre as DEC, o que foi confirmado no presente trabalho. A resistência à cefalotina, também relatada por outros autores, parece ser menos comum (SOUZA *et al.* 2009; GARCIA, SILVA e DINIZ (2011).

A taxa de infecções por *Campylobacter* vem aumentando no mundo, com número de casos, muitas vezes, superiores ao de *Salmonella* spp e *Shigella* spp (COKER *et al.*, 2002) provavelmente pela melhoria nos métodos de detecção e diagnóstico dessa bactéria (WASSENAAR, 1997).

*C. jejuni* é a principal causa de diarreia humana aguda nos países desenvolvidos (JANSSEN *et al.*, 2008). Cerca de 90% dos casos de campylobacteriose humana são causados por *C. jejuni*. A fração restante deve-se principalmente a *C. coli* (JAFARI *et al.*, 2008; JANSSEN *et al.*, 2008; AL JAROUSHA, EL JAROU e EL QOUGA, 2010).

A maioria dos países em desenvolvimento não possui programas de vigilância para doenças entéricas, portanto, valores de incidência de campylobacteriose geralmente não estão disponíveis (COKER *et al.*, 2002). Alguns estudos indicam que *Campylobacter* é isolado nos países em desenvolvimento em frequências que variam entre 5% a 20% (COKER *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2010; QUETZ *et al.*, 2010).

A frequência de *Campylobacter* na amostra analisada neste trabalho foi de 1%. A baixa frequência nessas amostras indica que a incidência de *Campylobacter* varia com a população estudada e com a região do país. Os poucos dados publicados a respeito da frequência deste gênero no Brasil, mostram desde a ausência, baixas frequências, (ARANDA *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2007; BUERIS *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2010) até frequências de 15% para essas bactérias (QUETZ *et al.*, 2010;).

Resistência à eritromicina foi relatada com baixa frequência (até 11%) em estirpes de *Campylobacter jejuni*. A resistência às quinolonas, como ciprofloxacina, varia de país para país com taxas entre 3% a 96% (RYAN *et al.*, 2005; CLSI, 2011). Das 4 estirpes de *Campylobacter* isoladas, apenas uma foi sensível a todos os

antimicrobianos testados. A resistência à ciprofloxacina foi observada em 75% dos isolados e à tetraciclina em 25%. Todas as estirpes foram sensíveis à eritromicina (Tabela 10). Frente ao crescimento da resistência de *Campylobacter* aos antimicrobianos utilizados no tratamento da campylobacteriose é importante que o teste de sensibilidade aos antimicrobianos seja realizado rotineiramente para esta bactéria.

*Shigella* spp, *P. shigelloides* e *Y. enterocolitica* não foram detectadas nas amostras provenientes dos dois laboratórios. Setenta por cento das infecções por *Shigella* acometem principalmente crianças com menos de 15 anos (PILLAY *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2003; ARAGON *et al.*, 2007). A distribuição dessas bactérias parece ser bem heterogênea, uma vez que este patógeno não foi encontrado, ou esteve presente em baixas frequências em vários estudos realizados no país (ARANDA *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2007; BUERIS *et al.*, 2007). No entanto são uma importante causa de diarreia no Brasil e chegam a ser isoladas em frequências que variam de 4% a 54% (DINIZ-SANTOS *et al.*, 2004; MORENO *et al.*, 2010; LOUREIRO *et al.*, 2010).

*Y. enterocolitica* é uma causa comum de enterocolite na Escandinávia e outros países europeus e nas áreas mais frias da América do Norte (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; GALINDO *et al.*, 2011). No Brasil, infecções por esta espécie não são relatadas com a mesma frequência que em vários outros países. Tal fato deve-se, ou a pequena ocorrência do microrganismo em nosso país, ou a não utilização das técnicas ideais para isolamento e caracterização dessa bactéria (FALCÃO e FALCÃO, 2006; PUPPULIN *et al.*, 2009).

Estudos mostram que *P. shigelloides* possui um baixo potencial patogênico independente do sítio isolado, do fenótipo ou do sorotipo a que pertença, o que é condizente com a baixa incidência da doença em humanos (ABBOTT, KOKKA e JANDA, 1991; JAGGER, 2000; SUREK *et al.*, 2010; LOUREIRO *et al.*, 2010).

Em resumo, os dados deste trabalho são relevantes para a saúde pública e mostram que *Aeromonas*, uma bactéria que não é pesquisada rotineiramente nos laboratórios, é a causa prevalente de diarreia nesta região geográfica. Além disso, as *E. coli* diarreogênicas têm uma participação significativa nos casos de diarreia

infecciosa, sendo aEPEC o patotipo predominante. Sugerimos que a pesquisa dessas bactérias seja implementada na coprocultura de rotina dos laboratórios.

## 7. CONCLUSÕES

- O índice de positividade para enteropatógenos bacterianos na amostra analisada foi de 20,7%.
- Os seguintes patógenos foram isolados: *Salmonella* spp (9,2%), *Aeromonas* spp (6,5%), estirpes de *E. coli* diarreogênicas (5,2%) e *Campylobacter* (1%). Não foram detectados casos de diarreia associados com *Shigella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp, *Plesiomonas shigelloides*, EIEC e ETEC.
- Foi verificada uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0066$ ) na distribuição de *Salmonella* spp entre as amostras do LACEN e LMC que apresentaram frequências de 11,5% e 2,1% respectivamente para este patógeno.
- A frequência de *Salmonella* em crianças de 0 - 5 anos foi significativamente menor ( $p=0,022$ ) que nas demais faixas etárias.
- Para *Aeromonas*, *Campylobacter* e DEC, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao total de enteropatógenos isolados entre as classes de idade estudadas.
- *Aeromonas* é uma causa importante de diarreia no Paraná, sendo *A. caviae* a espécie predominante. Por esta razão, a pesquisa dessas bactérias deveria ser incluída nas coproculturas de rotina.
- As estirpes diarreogênicas de *E. coli* contribuíram para uma parcela significativa dos casos de diarreia no Paraná, sendo aEPEC a que apresenta maior prevalência no Estado. A pesquisa deste grupo de patógenos requer testes especiais, mas deveria ser implementada ao menos nos laboratórios vinculados à Secretaria de Saúde do Estado.
- Resistência a um ou mais antimicrobianos foi detectada em todos os grupos de patógenos isolados neste estudo.

- Entre as *Aeromonas* a resistência mais comum foi à ampicilina (resistência intrínseca) (96,1%) seguida por amoxicilina/ácido clavulânico que foi observada em 26,9% das estirpes, cefoxitina em 23,1%, sulfametoxazol/trimetoprim 15,4% e tetraciclina 7,7%.
  
- Todas as estirpes de *Salmonella* foram resistentes ao menos a um dos antimicrobianos testados, sendo 83,8% resistentes ao ácido nalidíxico, 10,8% ao cloranfenicol, ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim e 13,5% à tetraciclina.
  
- Entre as estirpes de *E. coli* diarreogênicas 47,6% foram suscetíveis a todas as drogas testadas. Foi verificada a resistência a somente 2 dos 15 antimicrobianos testados. A resistência observada com maior frequência foi à ampicilina (52,4%) e apenas uma estirpe foi resistente à cefalotina.
  
- Entre as estirpes de *C. jejuni*, resistência à ciprofloxacina foi observada em 75% dos isolados à tetraciclina em 25%. Todas as estirpes foram sensíveis à eritromicina.

## REFERÊNCIAS

ABE, C.M.; TRABULSI, L.R.; LANCO, J.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; MORA, A.; FRANZOLIN M.R.; TADDEI, C.R.; MARTINEZ, M.B.; PIAZZA, R.M.F.; ELIAS, W.P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae+ EAF-negative stx- genetic profile. **Diagn Microbiol Infect Dis**, vol. 64, p.357–365, 2009.

ABBOTT S.L. Klebsiella, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas* and other *Enterobacteriaceae* In: Murray P.R *et al. Manual of clinical microbiology*, 8<sup>a</sup> ed. Washington,D.C: ASM Press, 2003. p.684-700.

ABBOTT, S.L.; KOKKA, R.P.; JANDA, J.M. Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. **J Clin Microbiol**, vol. 29, n.1, p.148-53, 1991.

ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONCALVES, A. G.; TRABULSI, L. R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J Clin Microbiol**, vol.36,n.3, p.662–668, 1998.

AFSET, J.E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **J Med Microbiol**, vol.53, p. 1137-1144, 2004.

AHMAD, M.; AGGARWAL, M.; AIJAZ, A. Bloody Diarrhea Caused by *Plesiomonas shigelloides* Proctitis in a Human Immunodeficiency Virus–Infected Patient. **Clin Infect Dis**, vol.7, p. 657, 1998.

ALCANTARA, A.K.; ESCAMILLA, J.; RANOA, C.P.; CROSS, J.H. *Plesiomonas shigelloides* in 11 Cases with Diarrhea at the San Lazaro Hospital. **Phil J Microbiol Infect Dis**, 1984, vol. 13, n.1, p.5-9, 1984.

AL JAROUSHA, A.M.; EL JAROU, M.A.; EL QOUQA, I.A. Bacterial enteropathogens and risk factors associated with childhood diarrhea. **Indian J Pediatr.** vol.78, n.2, p.165-70, 2011.

AMAYA, E.; REYES, D.; VILCHEZ, S.; PANIAGUA, M.; MÖLLBY, R.; NORD, C.E.; WEINTRAUB, A. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. **J Med Microbiol**, vol.60, p.216-222, 2011.

ARAGON, T.S.J.; VUGIA, D.J.; SHALLOW, S.; SAMUEL, M.C.; REINGOLD, A.; ANGULO, F.J.; BRADFORD, W.Z. Case-Control Study of Shigellosis in San Francisco: The Role of Sexual Transmission and HIV Infection. **Clin Infect Dis**, vol. 44, p.327–34, 2007.

ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, 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, p.145-50, 2007.

ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J Clin Microbiol**, v.42, n.12, p.5849-53, 2004.

ARAÚJO, J. M., TABARELLI, G. F., ARANDA, K. R. S., FABBRICOTTI, S. H., FAGUNDES-NETO, U., MENDES, C. M. D. & SCALETISKY, I. C. A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J Clin Microbiol**, vol. 45, 3396– 3399, 2007.

ASHIDA, H.; TOYOTOME, T.; NAGAI, T.; SASAKAWA, C. *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. **Molec Microbiol**, vol. 63, n.3, p.680–693, 2007.

BARROW, P.A. *Salmonella* - present, past and future. **Avian Pathology**, v.22, p.651-669, 1993.

BEHIRY, I.K.; ABADA, E.A.; AHMED, E.A.; LABEE, R.S. Enteropathogenic *Escherichia coli* Associated with Diarrhea in Children in Cairo, Egypt. **The Scien World J**, vol.11, p.2613–2619, 2011.

BESSESEN, M.T.; WANG, E.; ECHEVERRIA, P.; BLASER, M.J.; Enteroinvasive *Escherichia coli*: a Cause of Bacteremia in Patients with AIDS. **J Clin Microbiol**, V.29, n.11, p. 2675-2677, 1991.

BÉTIS, F.; BREST, P.; HOFMAN, V.; GUIGNOT, J.; BERNET-CAMARD, M. F.; ROSSI, B.; SERVIN, A.; 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, p.1068-74, 2003.

BOCKEMÜHL, J.; WONG, J.D. *Yersinia*. In: Murray PC. *et. al.* (eds.). **Manual of clinical microbiology**. 8th.ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. p.672-83.

BOPP, C.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCBINE, N. *Escherichia, Salmonella* and *Shigella*. In: BOPP, C.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCPBINE, N. **Man. Clin. Microbiol.** 7. Washington , D.C. ASM, 2003. p. 459-474.

BOSCHI-PINTO, C.; VELEBIT, L.; SHIBUYA, K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. **Buil World Health Organ**, vol. 86, p.710–717, 2008.

BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: The Charima Continues. **Clin Microbiol Rev**, 10, n.2, p. 257–276, 1997.

BOYLE, E.C.; BISHOP, J.L.; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. *Salmonella*: from Pathogenesis to Therapeutics. **J Bacteriol**, v.189, n.5, p. 1489–1495, 2007.



BRENER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 7 p. 2465–2467, 2000.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol.102, p. 839-844, 2007.

CABADA, M.M.; WHITE JR, A.C. Travelers' Diarrhea: An Update on Susceptibility, Prevention, and Treatment. **Curr Gastroenterol Rep**, vol. 10, n. 5, p.473-4799, 2008.

CAMPOS, L.C.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol. 99, n.6, p.545-552, 2004.

CERGOLE-NOVELLA, M.C.; NISHIMURA, L.S.; IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; CASTRO, A.F.P.; LEOMIL, L.; 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, p.234-239, 2006.

CDC. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses - selected sites. **MMWR**, vol.52, n.15, p.340-343, 2003.

CDC. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2003. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention Foodborne and Diarrheal Diseases Branch, **CDC**, 2004.

CDC. Update on Cholera — Haiti, Dominican Republic, and Florida. **MMWR**, vol.59, n.50, 2010.

CHIN, C.S.; SORENSON, J.; HARRIS, J.B.; ROBINS, W.P.; CHARLES, R.C.; JEAN-CHARLES, R.R.; BULLARD, J.; WEBSTER, D.R.; KASARSKIS, A.; PELUSO,

P.; PAXINOS, E.E.; YAMAICHI, Y.; CALDERWOOD, S.B.; MEKALANOS, J.; SCHADT, E.E.; WALDOR, M.K. The Origin of the Haitian Cholera Outbreak Strain. **N Engl J Med**, vol.364, p.33-42, 2011.

CHIU, C.; HU, S.; BAO, Q.; YU, J.; CHOU, Y.Y.; WANG, H.S.; LEE, Y.S. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n.5, p. 1690-1698, 2005.

CHIU, C.H.; SU, L.H.; CHU, C. *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. **Clin Microbiol Rev**, vol. 17, n.2, p. 311–322, 2004.

CLAESSON, B.E.B.; HOLMLUND, D.E.W.; LINDHAGEN, C.A.; MÄTZSCH, T.W. *Plesiomonas shigelloides* in a acute cholecystitis: a case report. **J Clin Microbiol**, vol. 20, n.5, p. 985-987, 1984.

CLARRIDGE, J.E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clin Microbiol Rev**, vol. 17, n. 4, p. 840–862, 2004.

CLEARY, J.; LAI, L.C.; SHAW, R.K.; IWANOWSKA, A.S.; DONNENBERG, M.S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiol**, vol. 150, p. 527-538, 2004.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first information supplement**. M100-S20. vol.30, n.1, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011.

CLSI. **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline M45-A**. vol.30, n.18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011.

COELHO M.I.S.; MENDES, E.S.; CRUZ, M.C.S.; BEZERRA, S.S.; SILVA, R.P.P. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, vol.32, n.1, p. 1-8, 2010.

COKER, A.O.; ISOKPEHI, D.R.; THOMAS, B.N.; AMISU, K.O.; OBI, C.L. Human Campylobacteriosis in Developing Countries. **Emerg Infect Dis**, vol. 8, n. 3, p.237-243, 2002.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, vol. 8, p.26-38, 2010.

DANIELS, N.A.; SHAFIIE, A. A Review of Pathogenic *Vibrio* Infections for Clinicians. **Infect Med**, vol.17, n.10, p.665-685, 2000.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. **Clin Microbiol Rev**, vol.12, n.3 p. 405–428, 1999.

DE LA CABADA BAUCHE, J.; DUPONT, H.L. New Developments in Traveler's Diarrhea. **Gastro Hepatol**, vol. 7, Issue 2, p.88-95, 2011.

DE TONI, F.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; KLASSEN, K.; IRINO, K.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; FIALHO, O.B.; FARAH, S.M.S.S.; FADEL-PICHETH, C.M.T. A prospective study on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Paraná state, Brazil. **Lett Appl Microbiol**, vol.48, p.645-647, 2009.

DIEMERT, D.J. Prevention and Self-Treatment of Traveler's Diarrhea. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n.3, p. 583–594, 2006.

DINIZ-SANTOS, D.R.; SANTANA, J.S.; BARRETO, J.R.; ANDRADE, M.G.; SILVA, L.R. Epidemiological and Microbiological Aspects of Acute Bacterial Diarrhea in Children from Salvador, Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, vol.9, n.1, p.77-83, 2005  
DIXON, B. 2008. Natural disaster microbiology. **Microbe**, vol.3, p.312–313, 2008.

DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, vol.60, n.10, p.3953-3961, 1992.

DONNENBERG, M. S.; 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.

DOSSO, M.; COULIBALY, M.; KADIO, A. Place des diarrhées bactériennes dans les pays en développement. **Bull Soc Path**, v.91, n.5, p.402-405, 1998.

DONTA, S.T.; MOON, H.W.; WHIPP, S.C. Detection of Heat-Labile *Escherichia coli* Enterotoxin with the Use of Adrenal Cells in Tissue Culture. **Science**, vol. 183, n.122, p. 334-336, 1974.

DULGUER, M.V.; FABBRICOTTI, S.H.; BANDO, S.Y.; MOREIRA-FILHO, C.A.; FAGUNDES - NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains: Phenotypic and Genetic Profiling Reveals a Strong Association between Enteraggregative *E. coli* Heat- Stable Enterotoxin and Diarrhea. **J Infect Dis**, vol. 188, p. 1685-1694, 2003.

DUPONT, H. L.; LEVINE, M. M.; HORNICK, R. B.; FORMAL, S. B. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. **J Infect Dis**, vol.159, n.6, p.1126 -1128, 1989.

EL-QOUGA, I, EL JAROU, M.A.; SAMAHA, A.S.A.; AFIFI, A.S.A.; AL JAROUSH, A.M.K.A. *Yersinia enterocolitica* infection among children aged less than 12 years: a case–control study. **Inter J Infect Dis**, vol.15, p. e48–e53, 2011.

ESSERS, B.; BURNENS, A.P.; LANFRANCHINI, F.M.; SOMARUGA, S.G.E.; VIGIER, R.O.V.; SCHAAD, U.B.; AEBI, C.A.; BIANCHETTI, M.B. Acute Community-Acquired Diarrhea Requiring Hospital Admission in Swiss Children. **Clin Infect Dis**, vol. 30, p.192–196, 2000.

ESTRADA-GARCIA, T.; LOPEZ-SAUCEDO, C.; THOMPONS-BONILLA, R.; ABONCE, M.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; SANTOS, J.I.; ROSADO, J.L.; DUPONT, H.L.; LONG, K.Z. Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. **J Clin Microbiol**, vol. 47, n.1, p. 93–98, 2009.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, vol. 30, n.1, p.24–32, 2012.

FALCÃO, J.P.; FALCÃO, D.P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, vol. 27, n.1, p. 9-19, 2006.

FALCÃO, J.P.; GIBOTTI, A.A.; SOUZA, R.A.; CAMPIONI, F.1.; FALCÃO, D.P. *Plesiomonas shigelloides*: um enteropatógeno emergente?. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 28, n.2, p.141-151, 2007.

FARMER III, J.J. Enterobacteriaceae: introduction and identificação in: Murray P.R *et al.* **Manual of clinical microbiology**, 8<sup>a</sup> ed. Washington, D.C: ASM Press, 2003.

FARMER III, J.J.; JANDA, J.M.; BIRKHEAD, K. *Vibrio* in: Murray P.R *et al.* **Manual of clinical microbiology**, 8<sup>a</sup> ed. Washington, D.C: ASM Press, 2003.

FERGUSON, W.W.; HENDERSON, N.D. Description of strain c27: a motile organism with the major antigen of *Shigella sonnei* phase I. **J Bacteriol**, vol 54, p. 179-181, 1974.

FIALHO, O.B. **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreio gênicas por PCR-Multiplex**. 106 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FIGUEIRAS, M.J. . Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. By 16S rDNA RFPL analysis. **Intern J Sistem Evolut Microbiol**, vol. 47, p.3742-3746, 2000.

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

FRANZOLIN, M. R.; ALVEZ, R. C.; KELLER, R.; GOMES, T.A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILORY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol. 100, p. 359–363, 2005.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H. Low Occurrence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Clinical, Food, and Environmental Samples: a Methodological Problem. **Clin Microbiol Rev**, vol.16, n.2, p.220-229, 2003.

GALANIS, E., D. M. LO FO WONG, M. E. PATRICK, N. BINSZTEIN, A. CIESLIK, T. CHALERMCHIKIT, A. AIDARA-KANE, A. ELLIS, F. J. ANGULO, AND H. C. WEGENER. World Health Organization Global Salm-Surv. Web-based surveillance and global Salmonella distribution, 2000–2002. **Emerg Infect Dis**, vol.12, p.381–388, 2006.

GALINDO, C.L.; ROSENZWEIG, J.A.; KIRTLEY, M.L.; CHOPRA, A.K. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. **J Pathogens**, VOL 2011, P.1-16, 2011.

GARCIA ,C.; CHINCHA , O.; LEON ,M.; IGLESIAS, D.; BARLETTA , F.; MERCADO, E.; OCHOA, T. Short Report: High Frequency of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Patients with and without Diarrhea in Lima, Perú. **Am J Trop Med Hyg**, vol. 82, n.6,p. 1118–1120, 2010.

GARCIA, P.G.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Occurrence and Antimicrobial Drug Susceptibility Patterns of Commensal and Diarrheagenic *Escherichia coli* in Fecal Microbiota from Children With and Without Acute Diarrhea **J Microbiol**, p.1-7, 2011

GHENGHESH, K.S.; AHMED, S.F.; EL-KHALEK, R.A.; AL-GENDY, A.; KLENA, J. *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. **J Infect Developing Countries**, vol. 2, n.2, p.81-98, 2008.

GILL, D.M.; RICHARDSON, S.H. Adenosine diphosphateribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. **J Infect Dis**, vol. 141, p. 64-70, 1980.

GILLESPIES, I.A.; O'BRIEN, S.J.; FROST, J.A.; TAM, C.; TOMPKINS, D.; NEAL, K.R.; SYED, Q.; FARTHING, M.J.G.; AND THE CAMPYLOBACTER SENTINEL SURVEILLANCE SCHEME COLLABORATORS. Investigating vomiting and/or bloody diarrhoea in *Campylobacter jejuni* infection. **J Med Microbiol**, vol.55, p. 741–746, 2006.

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

GRIMES, D.J. Ecology Of Estuarine Bacteria Capable of Causing Human Disease : A Review. **Estuaries**, vol. 14, n. 4, p. 345-360, 1991.

GUERRA, I.M.F.; FADANELLI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A.P.L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S.O.P.; ECHEVERRIGARAY, S.. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Braz J Microbiol**, v.38, p.638-643, 2007.

GUERRANT, R.L.; BRUNTON, L.L.; SCHNAITMAN, T.C.; REBHUN, L.I.; GILMAN, A.G. Cyclic Adenosine Monophosphate and Alteration of Chinese Hamster Ovary Cell Morphology: a Rapid, Sensitive In Vitro Assay for the Enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **Infect Immun**, vol.10, n.2, p. 320-327, 1974.

GUTH, B. E.; RAMOS, S. R.; CERQUEIRA, A. M.; ANDRADE, J. R.; 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**, vol.97, n.8, p.1085-9, 2002.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v.254, n.1, p.12-8, 2005.

HARVELL, C. D.; KIM, K.; BURKHOLDER, J. M.; COLWELL, R. R.; EPSTEIN, P. R.; GRIMES, D. J.; HOFMANN, E. E.; LIPP, E. K.; OSTERHAUS, A.D.; OVERSTREET, R.M.; PORTER, J.W.; SMITH, G.W.; VASTA, G.R. Emerging Marine Diseases-Climate Links and Anthropogenic Factors. **Science Magaz**, vol. 285, n. 5433, p.1505-1510, 1999.

HAYASHIDANI, H.; OHTOMO, Y.; TOYOKAWA, Y.; SAITO, M.; KANEKO, K.I.; KOSUGE, J.; KATO, M.; OGAWA, M.; KAPPERUD, G. Potential Sources of Sporadic Human Infection with *Yersinia enterocolitica* Serovar O:8 in Aomori Prefecture, Japan. **J Clin Microbiol**, vol.33, n.5, p. 1253–1257, 1995.

HENDRIKSEN, R.S.; VIEIRA, A.R.; KARLSMOSE, S.; WONG, D.M.A.L.F.; JENSEN, A.B.; WEGENER, H.C.; AARESTRUP, F.M.; Global Monitoring of Salmonella Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens Dis**, vol. 8, n.8, 2011.

HEUER, O.O.E.; PEDERSEN, K.; ANDERSEN, J.S.; MADSEN, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler. **Lett Appl Microbiol**, vol. 33, p.269-274, 2001.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; CAVALCANTI, V.O.; LIMA, N.V.; HENRIQUES, M.F.C.M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Rev Soc Bras MedTrop**, v.39, n. 2, p.217-220, 2006.



HORNEMAN, A. J.; ALI, A.; ABBOTT, S. L. *Aeromonas*. In MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology Press: Washington D.C., 9ed., v.1, p.716-721, 2007.

HUANG, D.B; MOHANTY, A; DUPONT, H.L; OKHUYSEN, P.C e CHIANG, T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol**, v. 55, p. 1303-1311, 2006.

INGRAM, C.W.; MORRISON JR, A.J.; LEVITZ, R.E. Gastroenteritis, Sepsis, and Osteomyelitis Caused by *Plesiomonas shigelloides* in an Immunocompetent Host: Case Report and Review of the Literature. **J. Clin. Microbiol**, vol 25, n.9, p. 1791-1793, 1987.

IRINO,K.; VAZ, T.M.I.; MEDEIROS, M.I.C.; KATO, M.A.M.F.; GOMES, T.G.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C. Serotype diversity as a drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. **J Med Microbiol**, 2007

JACKSON, M. P.; NEILL, R. J.; O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K.; 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**, vol.44, p.109-114, 1987.

JAFARI, F.; SHOKRZADEH, L.; HAMIDIAN, M.; SALMANZADEH-AHRABI, S.; ZALI MR . Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. **Jpn J Infect Dis**, vol.61, n. 4, p.269-273, 2008.

JAGGER, T.D. *Plesiomonas shigelloides* - a veterinary perspective. **Infect Dis Rev**, vol. 2, n.4, p.199-210, 2000.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S.L.The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clin Microbiol Rev**, vol. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

JANDA, J.M., Duffey, P.S Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. **Rev Infect Dis**, vol. 10, p. 980 - 1987. 1988.

JANDA, J.M.; POWERS, C.; BRYANT, R.G.; ABBOTT, S.L. Current Perspectives on the Epidemiology and Pathogenesis of Clinically Significant *Vibrio spp.* **Clin Microbiol Rev**, vol.1, n.3, p.245-267, 1988.

JANSSEN, R.; KROGFELT, K.A.; CAWTHRAW, S.A.; VAN PELT, W.; WAGENAAR, J.A.; OWEN, R.J. Host-Pathogen Interactions in *Campylobacter* Infections: the Host Perspective. **Clin Microbiol Rev**, vol. 21, n.3, p. 505–518, 2008.

JIANG, Z.D.; DUPONT, H.L.; BROWN, E.L.; NANDY, R.K.; RAMAMURTHY, T.; SINHA, A.; GHOSH,S.; GUIN,S.; GURLEEN, K.; RODRIGUES,S.; CHEN, J.J.; MCKENZIE,R.;STEFFEN, R. Microbial Etiology of Travelers' Diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: Importance of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* Species. **J Clin Microbiol**, vol. 48, n.4, p. 1417-1419, 2010.

KAIN, K.C.; KELLY, M.T.; Clinical Features, Epidemiology, and Treatment of *Plesiomonas shigelloides* Diarrhea. **J Clin Microbiol**, vol. 27, n.5, p. 998-1001, 1989.

KAPER, J.B.; MORRIS JR. J.B.; LEVINE, M.M.. Cholera. **Clin Microbiol Rev**, vol. 8, n.1, p. 48–86, 1995.

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

KARMALI, M. A.; STEELE, B.T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxinproducing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, vol. 321, issue.8325, p.619–620, 1983.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull. W.H.O.** vol. 81, p.197–204, 2003.

KOTLOFF, K. L.; WINICKOFF, J. P.; IVANOFF, B.; CLEMENS, J. D.; SWERDLOW, D. L.; SANSONETTI, P. J.; ADAK, G. K.; LEVINE M. M.. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull. W. H. O.** vol. 77, p.651–666, 1999.

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

LAI, C.Y.; HUANG, L.T.; KO, S.F.; CHUANG, J.H.; LIN, J.W.; TIAO, M.M. Salmonella Gastroenteritis Complicated with Bacteremia and Ruptured Cholangitis in an Infant with Congenital Choledochal Cyst . **J Formos Med Assoc**, vol.106, n.3 , S20-S22, 2007.

LAN, R.; REEVES, P.R. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. **Microb Infect**, vol. 4, p.1125–1132, 2002.

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

LEE, T.M.; CHANG, C.Y.U.; CHANG, L.L.I.; CHEN, W.M.; WANG, T.K.; CHANG, S.F. One predominant type of genetically closely related *Shigella sonnei* prevalent in four sequential outbreaks in school children. **Diag Microbiol Infect Dis**, vol. 45, issue.3, p.173-181, 2003.

LIPP, E.K.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Effects of Global Climate on Infectious Disease: the Cholera Model. **Clin Microbiol Rev**, vol.15, n.4, p.403-431, 2004.

LONG,C.; JONES, T.F.J.; VUGIA, D.J.; SCHEFTEL, J.; STROCKBINE, N.; RYAN, P.; SHIFERAW, B.; ROBERT V. TAUXE, R.V.; GOULD, L.H. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* Infections, FoodNet, 1996–2007. **Emerg Infect Dis**, vol. 16, n.3, 2010.

LOPEZ-SAUCEDO, C.; CERNA, J. F.; VILLEGAS-SEPULVEDA, N.; THOMPSON, R.; VELAZQUEZ, F. R.; TORRES, J.; TARR, P. I.; ESTRADA-GARCIA, T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, vol. 9, n.1, Jan, p.127-31, 2003.

LOUREIRO, E.C.B.; SOUZA, C.O.; SOUSA, E.B.; SANTOS, D.V.; ROCHA, D.C.C.; RAMOS, F.L.P.; SILVA, M.C.M. Detection of enteropathogenic bacteria and enteroparasites in patients with acute diarrhea in Juruti, Pará, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude**, vol. 1, n., p.143-148, 2010.

LU, J.J.; PERNG, C.L.; LEE, S.Y.; WAN, C.C. Use of PCR with Universal Primers and Restriction Endonuclease Digestions for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid. **J Clin Microbiol**, vol. 38, n. 6, p. 2076-2080, 2000.

LUSCHER, D.; 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**, vol.8, n.4, p.285-90, 1994.

MANDAL, B.K.; WHALE, K.; MORSON, B.C. Acute colitis due to *Plesiomonas shigelloides*. **Br Med J (Clin Res Ed)**. vol. 285, n.6354, p. 1539–1540, 1982.

MARAGKOUidakis, R.; POULIDAKI, S.R.; PAPADOMANOLAKI, E.; ALEVRAKI, G.; PAPADOGIANNI, M.; OIKONOMOU, N.; FANOURGIAKIS, P. Empiric antimicrobial therapy and infectious diarrhea. Do we need local guidelines? **European J Internal Med**, vol. 22, p.60–62, 2011.

MARTNEZ-MURCIA, A.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M.D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. **Int J Syst Bacteriol**, vol.42, p.412–421, 1992.

MARTINS, A.G.L.A.; NASCIMENTO, A.R.; VIEIRA, R.H.S.F.; SERRA, J.L.; ROCHA, M.M.R.M. Quantificação e Identificação de *Aeromonas Spp.* em águas de Superfície do Estuário do Rio Bacanga em São Luís / Ma (Brasil). **B.CEPPA, Curitiba**, vol. 27, n. 1, p. 107-118, 2009.

MCLAUGHLIN, J.B.; DEPAOLA, A.; BOPP, A.C.; MARTINEK, K.A.; NAPOLILLI, N.P.; ALLISON, C.G.; MURRAY, S.L.; THOMPSON, E.C.; BIRD, M.M.; MIDDAUGH, J.P. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Gastroenteritis Associated with Alaskan Oysters. **N Engl J Med**, vol. 353, n.14, p.1463-1470, 2005.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerg Infect Dis**, vol. 5, n. 5, 1999.

MENARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit Rev Microbiol**, vol. 28, n.1, p.43-60, 2002.

MERSON, M. H.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; SACK, R. B.; HUQ, I.; KOSTER, F. T. Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, vol.23, n.2, p.325-9, 1979.

MONDINO, S.S.B.; NUNES, M.P.; RICCIARDI, I.D. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in Water Environments of Rio de Janeiro City. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol. 90, n.1, p.1-4, 1995.

MORENO, A.C.; FILHO, A.F.; GOMES, T.A.; RAMOS, S.T.; MONTEMOR, L.P.; TAVARES, V.C.; FILHO, L DOS SANTOS, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M.B. Etiology

of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn Microbiol Infect Dis**, vol. 66, p.50-57, 2010

MOYO, S.J.; MASELLE, S.Y.; MATEE, M.I.; LANGELAND, N.; MYLVAGANAM, H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania Sabrina. **BMC Infect Dis**, vol.7, n.92, p.1-7, 2007.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C.; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis out – breaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 39, n.3, 529-534, 2008.

MURRAY,P.R.; ROSENTAHL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro; Elsevier, 2006.

NACHAMKIN, I.; *Campylobacter e Arcobacter* in: Murray P.R *et al*. **Manual of clinical microbiology**, 8<sup>a</sup> ed. Washington, D.C: ASM Press, 2003.

NATARO, J.K.; BOPP, C.A.; FIELDS, P.I.; KAPER, J.B.; 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. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Curr Opin Gastroenterol**. V. 21, p. 4–8, 2005.

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

NATARO, J. P.; STEINER, T. S.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis** vol. 4, p.251–261, 1998.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. AggR, a transcriptional

activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, vol.176, n.15, p.4691-9, 1994.

NA-UBOL, M.; SAMOSORNSUK, S.; VON SEIDLEIN, L.; TAPCHASRI, P.; ALI, M.; CLEMENS, J.D.; CHAICUMPA, W. Molecular characteristics of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhoea in a new industrialized area of Thailand. **Epidemiol Infect**, vol. 134, p. 997–1003, 2006.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W.P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, vol.2, n.1, p.13-24, 2011.

NEALL, KR.; SCOTT, H.M.; SLACK, R.C.B.; LOGAN, R.F.A. Omeprazole as a risk factor for *campylobacter* gastroenteritis: case-control study. **BMJ**, vol. ;312, p.414-415, 1996.

NEWELL, D.G. The ecology of *Campylobacter* in avian and human hosts and in the environment. **Int J Infect Dis**, vol.6, p. 3S16-3S21, 2002.

NGUYEN, T. V.; VAN,P. L.; HUY,C. L.; GIA, K. N.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **J Clin Microbiol**, vol.43, p.755–760, 2005.

OCHOA, T.J.; ECKER, L.; BARLETTA, F.; MISPIRETA, M.; GIL, A.I.; CONTRERAS, C.; MOLINA, M.; AMEMIYA, I.; VERASTEGUI, H.; HALL, E.R.; CLEARY, T.G.; LANATA, C.F. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *E. coli* in infants from peri-urban areas of Lima, Peru. **Clin Infect Dis**,. vol.49, p.1694–1702, 2009.

O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R.K. Shiga And Shiga-Like Toxins. **Microbiol Rev**, vol. 51, p.206–220, 1987.

O'BRIEN, A. D.; LIVELY, T.A.; CHEN, M.E.; ROTHMAN, S.W.; FORMAL, S.B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United

States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. **Lancet**, vol. 321, issue. 8326, p.702, 1983.

O'BRIEN, S.J.; ELSON, R.; GILLESPIE, I.A.; ADAK, G.K.; COWDEN, J.M. Surveillance of foodborne outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992 – 1999: contributing to evidence-based food policy?. **Public Health**, vol. 116, p.75–80, 2002.

OKEKE, I.N.; NATARO, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet Infect Dis**, vol 1, p.304-313, 2001.

OLIVEIRA, F.A.; GEIMBA, M.P.; PASQUALOTTO, A.; BRANDELLI, A.; PASQUALI, G.; SILVA, W.P.; TONDO, E.C. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**, vol.20, p.606–610, 2009.

OLSVIK, O.; 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.

ON, S.L.W. Identification Methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and Related Organisms. **Clin Microbiol Rev**, vol. 9, n.3, p. 405–422, 1996.

ORLANDI, P.P.; MAGALHÃES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; SILVA, L.H.P. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz J Med Biol Res**, vol. 39, n.4, p.505-517, 2006.

OZDEMIR, O.; SARI, S.; TERZIOGLU, S.; ZENCIROGLU, A. *Plesiomonas shigelloides* Sepsis and Meningoencephalitis in a Surviving Neonate. **J Microbiol Immun Infec**, vol. 43, n. 4, p. 344–346, 2010.



PUPULIN, A.R.T.; CARVALHO, P.G.; NISHI, L.; NAKAMURA, C.V.; GUILHERM, A.L.F. Enteropatógenos relacionados à diarreia em pacientes HIV que fazem uso de terapia anti-retroviral. **Rev Soc Bras Med Trop**, vol. 42, n.5, p.:551-555, 2009.

PARKER, J.L.; SHAW, J.G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **J Infect**, vol.62, 109-118, 2011.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiol Lett**, vol. 252, p.11-18, 2005.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin Microbiol Rev**, vol.11, p.450-479, 1998.

PATON, A.W.; PATON, J.C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. **J Clin Microbiol**, vol. 40, n.1, p.271-4, 2002.

PAZZAGLIA, G.; SACK, R.B.; SALAZAR, E.; YI, A.; CHEA, E.; LEON-BARUA, R.; GUERRERO, C.E.; PALOMINO, J. High frequency of coinfecting enteropatogens in *Aeromonas* associated diarrhea of hospitalized Peruvian infants. **J Clin Microbio**, vol. 29, n.6, p.1151-1156, 1991.

PENNER, J. L. The Genus *Campylobacter*: a Decade of Progress. **Clin Microbiol Rev**, vol. 1, n.2, p. 157-172, 1988.

PEREIRA, C.S.; AMORIM, S.D.; SANTOS, A.F.M.; SICILIANO, S.; MORENO, I.B., OTT, P.H., RODRIGUES, D.P. *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonadaceae* family pathogens isolated from marine mammals of southern and southeastern Brazilian coast. **Braz J Microbiol**, vol. 39, p.749-755, 2008.

PIAZZA, R.M.F.; ABE, C.M.; HORTON, D.S.P.Q.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Detection and subtyping Methods of Diarrheogenic

*Escherichia coli* Strains In: **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p.95-115, 2010.

PILLAY, D.G.; KARAS, J.A.; PILLAY, A.; STURM, A.W. Nosocomial transmission of *Shigella dysenteriae* type 1. **J Hosp Infect**, vol.37, p.199-205, 1997.

PUPO, G.M.; LAN, R.; REEVES, P.R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of . and convergent evolution of many of their characteristics. **Proc Natl Acad Sci**, vol.97, n.19, p.10567–10572, 2000.

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

QUETZ, J.S.; LIMA, I.F.N.; HAV, A.; CAVALCANTE, P.A.; MEDEIROS, P.H.Q.S.; CID, D.A.C.; MORAES, M.L.; REY, L.C.; SOARES, A.M.; MOTA, R.M.S.; WEIGL, B.H.; GUERRANT, R.L.; LIMA, A.A.M. *Campylobacter jejuni* infection and its virulence associated genes among children with moderate to severe diarrhea attended at emergency rooms in Northeastern Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, vol.67, p.220–227, 2010.

RAJENDRAN, P.; AJJAMPUR, S.S.R.; CHIDAMBARAM, D.; CHANDRABOSEA, G.; HANGARAJ, B.; SARKAR, R.; SAMUEL, P.; RAJAN, D.P.; KANG, G. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. **Diagn Microbiol Infect Dis**, vol. 68, p.117–122, 2010.

REIDL, J.; KLOSE, K.E. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. **FEMS Microbiol Rev**, vol.26, p.125-139, 2002.

RAHMAN, M.; HUYS, G.; KÜHN, I.; RAHMAN, M.; MÖLLBY, R. Prevalence and transmission of antimicrobial resistance among *Aeromonas* populations from a duckweed aquaculture based hospital sewage water recycling system in Bangladesh. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 96, p.313–321, 2009.

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.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect.**, v.10, n.10, p.1797-1805, 2004.

RODRIGUESZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud pública de México**, vol.44, n.5, p.464-475, 2002.

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C.M.; MORELLI, A.; DE BATISTA, G.C.Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. **J Clin Microbiol**, vol. 42, p.398–400, 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, T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L.. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N Engl J Med**, vol. 308, p.681–685, 1983.

RYAN, M,O.; PRADO, V.; PICKERING, L.K.; FAAP. A Millennium Update on Pediatric Diarrheal Illness in the Developing World. **Semin Pediatr Infect Dis**,vol.80, n.16, p.125-136, 2005.

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

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

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

SAMUEL,M.C.; VUGIA,D.J.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; SEGLER, S.; MCGIVERN, T.; KASSENBOG,H.; REILLY, K.; KENNEDY, M.; ANGULO, F.;

TAUXE, R.V.; FOR THE EMERGING INFECTIONS PROGRAM FOODNET WORKING GROUP. Epidemiology of Sporadic Campylobacter Infection in the United States and Declining Trend in Incidence, FoodNet 1996–1999. *Clin Infect Dis*, vol.38, Suppl 3, p.S165–S174, 2004.

SANSONETTI, P. Host–pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* . vol.50, Suppl. 3, S2–S8, 2002.

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**, vol. 90, n.7, p.3093-7, 1993.

SCALETSKY, I.C.A.; ARANDA,K.R.S.; SOUZA, T.B.; SILVA, N.P. Adherence Factors in Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Expressing the Localized Adherence-Like Pattern in HEp-2 Cells. **J Clin Microbiol**, vol. 48, n.1, p. 302–306, 2010.

SCALETSKY, I.C.A.; FABBRICOTTII, S.H.; ARANDA, K.R.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, vol.40, p.1254–1258. 2002a

SCALETSKY, I.C.A.; FABBRICOTTII, S.H.; SILVA, S.O.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. HEp-2 adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis**, vol.8, p.855–858, 2002b

SCALETSKY, I.C.A.; PEDROSO, M.Z.; OLIVA, C.A.G.; CARVALHO, R.L.B.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea. **Infect Immun**, vol. 67, n.7, p. 3410–3415, 1999.

SCALETISKY, I.C.A.; SILVA, M.L.M.; TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect Immun**, vol.45, n.2, p.534-536, 1984.

SCAVIA, G.; STAFFOLANI, M.; FISICHELLA, S.; STRIANO, G.; COLLETTA, S.; FERRI, G.; ESCHER, M.; MINELLI, F.; CAPRIOLI, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **J Med Microbiol**, vol. 57, p.1141–1146, 2008.

SCHROEDER, G.N.; HUBERT HILBI. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. **C Microbiol Rev**, vol. 21, n.1, p.134–156, 2008.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity Island in Bacterial Pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev**, vol. 17, p. 14-56, 2004.

SCHMIDT, A. LEeways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. **Cell Microbiol**, vol.12, n.11, p.1544–1552, 2010.

SEARS, C. L. e KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol Rev**, vol.60, n.1, p.167-215, 1996.

SERVIN, A.L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol Rev**, vol. 18, n. 2, p. 264-292, 2005.

SOLER, L.; YANEZ, M.A.; CHACÓN, M.R.; AGUILERA ARREOLAM, M.G.; CATALAN, V.; FIGUERAS, M.J.; MARTINEZPMURCIA, A.J. Intern j sistem evotution microbiol, v.54, p.1511-1519, 2004.

SOUZA, T.B.; MORAIS, M.B.; TAHAN, S.; MELLI, L.C.F.L.; MIRIAN RODRIGUES, M.S.C.; SCALETISKY, I.C.A.; SOUZA High prevalence of antimicrobial drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in asymptomatic children living in an urban slum. **J Infect**, vol. 59, p.247-251, 2009.

SPANGLER, B.D. Structure and Function of Cholera Toxin and the Related *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxins. **Microbiol Rev**, vol.56, n.4, p.622-647, 1992.

SPANO, L.C.; SADOVSKY, A.D.I.; SEGUI, P.N.; SAICK, K.W.; KITAGAWA, S.M.S.; PEREIRA, F.E.L.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea Liliana C. *J Med Microbiol*, vol. 57, p.359–363, 2008.

STANCY-PHIPPS, S.; MECCA, J.J.; WEISS, J.B. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. **J Clin Microbiol**, v. 33, n.5, p. 1054–1059, 1995.

SUREK, M.; VIZZOTTO, B.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DALLAGASSA, C.B.; FARAH, S.M.S.S.; FADEL-PICHETH, C.M.T. Identification and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from stool samples of Brazilian subjects with diarrhoea and healthy controls. **J Med Microbiol**, v.59, p.373-374, 2010.

TENNANT, S.M.; TAUSCHEK, M.; AZZOPARDI, K.; BIGHAM, A.; BENNETT WOOD, V.; HARTLAND, E.L.; QI, W.; WHITTAM, T.S.; ROBINS-BROWNE, R.M. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. **BMC Microbiol**, vol.9, p. 117, 2009.

THAKUR, S.; GEBREYES, W.A. *Campylobacter coli* in Swine Production: Antimicrobial Resistance Mechanisms and Molecular Epidemiology. **J Clin Microbiol**, 2005, vol.43, n.11, p. 5705–5714, 2005.

THOMPSON, F.L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of Vibrios. **Microbiol Molec Biol rev**, vol. 68, n.3, p.403-431, 2004.

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.

TSUKAMOTO,B.T.; KINOSHITA,Y.; TOSHIO SHIMADA, T.; SAKAZAKI, R. Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. **J Hyg Camb**, vol. 80, p. 275-280, 1978.

TULSIDAS, H.; ONG, Y.Y.; CHAN, K.C. *Aeromonas hydrophila* bacteraemia and portal pyaemia. **Singapore Med J**, vol.49, n.4, p.346, 2008.

TZIPORI, S.; SHEORAN,A.; AKIYOSHI, D.; DONOHUE-ROLFE, A.; TRACHTMAN. H. Antibody Therapy in the Management of Shiga Toxin-Induced Hemolytic Uremic Syndrome. **Clin Microbiol Rev**, vol.17, n.4, p. 926–941, 2004.

UNICEF/WHO. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done, 2009, disponível em [http://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/9789241598415/en/](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241598415/en/). Acesso em 10/11/2010.

VAN LOON, F.P.L.; ZEAUR RAHIN, Z.; CHOWDHURY, .K.A.; BRADFORD A. KAY, B.A.; RAHMAN, S.A. Case Report of *Plesiomonas shigelloides* Associated Persistent Dysentery and Pseudomembranous Colitis. **J Clin Microbiol**, vol. 27, n.8, p. 1913 1915, 1989.

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

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; KATO, M.A.M. F.; DIAS, Â.M.G.; GOMES, T.A.T.; MEDEIROS, M.I.C.; ROCHA, M.M.M.; GUTH, B.E.C. Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 2, p. 903- 905, 2004.

VIDAL, M.; KRUGER, E.; DURÁN, C.; LAGOS, R.; LEVINE, M.M.; PRADO, M.; TORO, C.; VIDAL, R. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. **J Clin Microbiol**, vol. 43, n.10, p. 5362–5365, 2005.

VIEIRA N, BATES SJ, SOLBERG OD, PONCE K, HOWSMON R, CEVALLOS W, TRUEBA, G.; RILEY, L.; EISENBERG, J.N.S.\* High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. **Am J Trop Med Hyg**, vol.76, p.528–533, 2007.

VIRDI, J.S.; SACHDEVA, P.. Molecular heterogeneity in *Yersinia enterocolitica* and “*Y. enterocolitica-like*” species – Implications for epidemiology, typing and taxonomy. **FEMS Immun Med Microbiol**, vol.45, p.1–10, 2005.

ZAMBONI, A.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. *Enteroaggregative Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J Clin Microbiol**, vol.42, p.1058–1063, 2004.

ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Spices and herbs as source of Salmonella-related foodborne diseases. **Food Research Internat**, vol. 45, issue 2, p.765-769, 2011.

YANG, J.R.; WU, F.T.; TSAI, J.L.; UM, J.J.; LIN, L.F.; CHEN, K.L.; KUO, S.H.S.; CHIANG, C.S.; WU, H.S. Comparison between O Serotyping Method and Multiplex Real-Time PCR To Identify Diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. **J Clin Microbiol**, vol.45, n.11, p. 3620–3625, 2007.

YONGSI, H.B.N. Pathogenic Microorganisms Associated With Childhood Diarrhea in Low-and-Middle Income Countries: Case Study of Yaoundé – Cameroon. **Int J Environ Res Public Health**, vol.5, p. 213-229, 2008.

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

WASSENAAR, T.M. Toxin Production by *Campylobacter spp.* **Clin Microbiol Rev**, vol. 10, n.3, p. 466–476, 1997.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J Med Microbiol**, vol. 56, p.4–8, 2007.



WHO. **HEALTH TOPICS- CAMPYLOBACTER.** <http://www.who.int/topics/campylobacter/en/>. Acesso em 03/12/2011

WHO. **HEALTH TOPICS- Salmonella.** <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>. Acesso em 10/01/2012.

WIEGERING, V.; KAISER, J.; TAPPE, D.; WEIßBRICH, B.; MORBACH, H.; GIRSCHICK, H.J. Gastroenteritis in childhood: a retrospective study of 650 hospitalized pediatric patients Verena. **Inter J of Infect DiS**, vol. 15, p.e401–e407, 2010.

WILLIAMS, D.N.; TORRES, A.G.; LLOYD, S.J. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*, in: Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. p.8-24, 2010.

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

## **ANEXO**

Aprovação do comitê de ética



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa



Curitiba, 07 de outubro de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Cyntia M.F. Fadel-Picheth**

**Nesta**

Prezado (a) Pesquisador (a),

Comunicamos que a solicitação de continuidade da pesquisa intitulada **“Bactérias causadoras de diarreia”**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em 07 de outubro de 2009.

Registro **CEP/SD**: 320.SM.102.06.12    **CAAE**: 0053.0.000.091-06

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

**Data para entrega do relatório final ou parcial: 07/04/2010.**

Atenciosamente

**Profa. Dra. Liliana Maria Labronici**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Setor de Ciências da Saúde

Prof. Dra. Liliana Maria Labronici  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa - SBU/UFPR