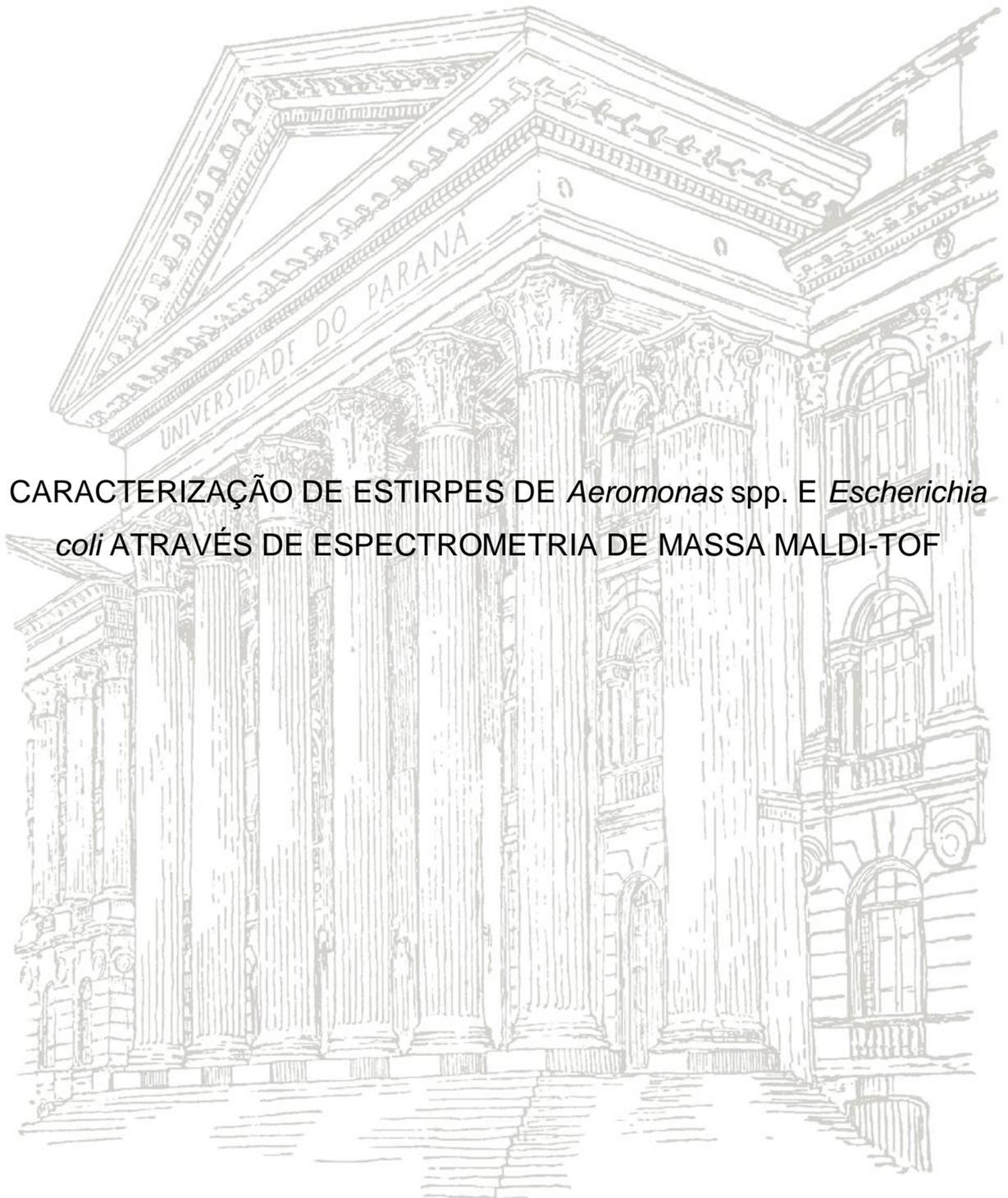


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CIBELLE DE BORBA DALLAGASSA



CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Aeromonas* spp. E *Escherichia coli* ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

CURITIBA

2012

CIBELLE DE BORBA DALLAGASSA

CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Aeromonas* spp. E *Escherichia coli*  
ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cyntia M T.Fadel- Picheth

Co-Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda S. Chubatsu

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Luciano Huergo

CURITIBA

2012

Dallagassa, Cibelle de Borba

Caracterização de estirpes de *Aeromonas spp* e *Escherichia coli*  
através de Espectrometria de Massa MALDI-TOF / Cibelle de Borba  
Dallagassa – Curitiba, 2012.

69 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth  
Dissertação (mestrado) –Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade  
Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Espectrometria de massa. 2. MALDI\_TOF. 3. *Aeromonas spp*.  
4. *Escherichia coli*. I. Fadel-Picheth, Cyntia Maria Telles.  
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.01

# **TERMO DE APROVAÇÃO**

**CIBELLE DE BORBA DALLAGASSA**

**Título: CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE AEROMONAS SPP.. E ESCHERICHIA COLI ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cyntia M.T. Fadel Picheth  
Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dra. Dayane Alberton  
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 1º de março de 2012.

## AGRADECIMENTOS

Eu realmente me sinto uma pessoa privilegiada e por isso só tenho a agradecer todas as oportunidades que tenho recebido.

Não tenho palavras para expressar a minha gratidão a Professora Cyntia. Muito obrigada pelas inúmeras oportunidades, confiança, respeito e aprendizagem. Todos esses anos foram de extrema importância para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

A equipe do laboratório, companheiras de bancada, de alegrias e frustrações experimentais, em especial Ana Caroline, Carol Tanaka, Cristina, Marina, Flávia, Suélen, Bruno e Mônica, muito obrigado por todo apoio, companheirismo, e descontração.

Agradeço ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) pelas amostras gentilmente cedidas, e em especial a Sônia Farah por todo incentivo e apoio.

Aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica, da UFPR, agradeço o apoio técnico, estrutural e científico, em especial ao Valter, e os meus co-orientadores Prof.<sup>a</sup> Leda e Prof.<sup>a</sup> Luciano, pela oportunidade, confiança, paciência e por todos os ensinamentos que permitiram a construção deste trabalho. Agradeço em especial a Maria Isabel Stets, por todo apoio, tempo, e sugestões.

À minha família agradeço pela oportunidade de estudar Farmácia e me dedicar ao Mestrado. Obrigada pela compreensão, pelo carinho e apoio. Em especial agradeço à minha mãe Rosane, ao meu pai Aolevir e à minha irmã Simone. Obrigada as minhas queridas amigas Ivi Lage e Juliana Okagima.

Obrigada Thiago. Meu querido companheiro, por me incentivar, planejar a e sonhar comigo desde o vestibular. Obrigada por estar sempre presente e acima de tudo acreditar no meu potencial. Sem você eu não teria conseguido.

*“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”*

Albert Einstein

## RESUMO

*Aeromonas* spp. são bactérias capazes de causar uma série de infecções em humanos, variando de diarreia não complicada até meningite e septicemia. *Escherichia coli* fazem parte da microbiota intestinal de humanos, onde são benéficas para o hospedeiro. No entanto existem estirpes patogênicas capazes de causar infecções intestinais, denominadas *E. coli* diarreio gênicas (DEC), e extra-intestinais (ExPEC) como as *E. coli* uropatogênicas (UPEC). O objetivo desse trabalho foi caracterizar estirpes de *Aeromonas* spp. e *E. coli* através de Espectrometria de Massa MALDI-TOF. Foram analisadas 99 estirpes de *Aeromonas* spp. e 143 estirpes de *E. coli*, incluindo comensais isoladas da microbiota intestinal, patotipos, e estirpes de referência. As bactérias foram cultivadas em ágar MacConkey por 18 horas, a  $36\pm 1^\circ\text{C}$ , ao ar. O extrato celular preparado a partir de ~10 colônias foi utilizado para análise. O ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/ml) dissolvido em acetonitrila:ácido trifluoroacético 2,5% (1:1) foi utilizado como matriz. Alíquotas dos extratos foram analisadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF-MS (Autoflex; Bruker Daltonics) equipado com um laser de nitrogênio (337nm) (Bruker Daltonics). Os íons positivos foram obtidos utilizando uma aceleração de 20Hz no modo linear. Os espectros resultaram da soma dos íons obtidos de 100 tiros do laser em 10 posições diferentes da amostra. A aquisição dos espectros foi realizada de forma manual com uma resolução mínima de 600 arb e máxima de 1500 arb e analisados em uma faixa de relação carga/massa ( $m/z$ ) de 3.000 a 20.000 Da. O processamento dos espectros foi realizado utilizando o software Flex Analysis v. 3.0 (Bruker Daltonics). Para *E. coli* os ensaios foram feitos em triplicata, e para *Aeromonas* spp em triplicata e em duas datas diferentes. Os espectros gerados foram analisados com o software Speclust gerando a lista de picos em comum e um dendrograma. Os picos  $m/z$  4259, 5051, 6304 foram detectados em todas as estirpes de *Aeromonas* analisadas, o que indica que podem ser marcadores para bactérias deste gênero. O pico  $m/z$  9180 foi observado em *Aeromonas* spp e *E. coli*, mas é importante para a identificação de *Aeromonas*. A espectrometria de massa MALDI-TOF foi capaz de diferenciar as espécies de *Aeromonas*. Dois picos,  $m/z$  5380 e 7271, foram encontrados em todas as estirpes de *E. coli* analisadas. Os picos  $m/z$  4364, 5095, 6253, 6314, 9060 e 9532 foram observados em 92 a 99% das *E. coli*. Estes picos são importantes para identificar *E. coli*. Foi possível diferenciar o grupo das *E. coli* comensais e das UPEC das demais categorias dessa bactéria. A metodologia de MALDI-TOF tem capacidade para distinguir as bactérias estudadas, no entanto é necessário otimizar a metodologia para distinguir maior número dos grupos de *E. coli*.

Aqui: Palavras-chave: MALDI-TOF; *Aeromonas*, *E. coli*.

## ABSTRACT

*Aeromonas* spp are bacteria associated with human infections varying from diarrhea to meningitis and septicemia. *Escherichia coli* are part of intestinal microbiota of humans where are beneficial to host. However there are several pathogenic strains able to cause intestinal infections, called diarrheagenic *E. coli* (DEC), and extra-intestinal infections (ExPEC), as uropathogenic *E. coli* (UPEC). The aim of this work was to characterize *Aeromonas* and *E. coli* strains using MALDI-TOF Mass Spectrometry. We analyzed 99 *Aeromonas* strains, and a total of 143 *E. coli* including commensal, pathotypes and reference strains. Bacteria were grown overnight on MacConkey agar at  $36\pm 1^\circ\text{C}$ , under air. Cells extracts were prepared with ~10 colonies. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (10mg/ml) in acetonitrile:2,5% trifluoroacetic acid (1:1) was used as matrix. Aliquots of extracts were analyzed in a MALDI-TOF mass spectrometer (Autoflex, Bruker Daltonics) equipped with a nitrogen laser (337 nm). The positive ions were obtained with a 20 Hz acceleration in linear mode. The spectra were obtained from the sum of 100 laser shots in 10 different positions of sample. Acquisition of spectra was performed manually with a minimum resolution of 600 and maximum of 1500 arb, in a range of 3000 – 20000 Da. Processing of spectra was done with Flex Analysis v.3 (Bruker Daltonics). For *E.coli* tests were realized in triplicates, and for *Aeromonas* spp in triplicates and at 2 different days. The spectra were analyzed with software SPECLUST which generated lists of common peaks and a dendrogram. Peaks m/z 4259, 5051, 6304 were found in all *Aeromonas* strains, indicating that may be markers for the genera. Peak m/z 9180 was found in *Aeromonas* spp and also in *E. coli*, but is also important to identification of *Aeromonas*. MALDI-TOF mass spectrometry allowed to distinguish *Aeromonas* species. In *E. coli*, peaks m/z 5380 and 7271 were found in all strains. Peaks m/z 4364, 5095, 6253, 6314, 9060 and 9532 were detected in 92 to 99% of *E. coli*. All these peaks are important to identify *E. coli* strains. In addition, commensal *E. coli* strains and UPEC strains were distinguished from other categories of these bacteria. The MALDI-TOF methodology has the ability to distinguish the bacteria studied, however it should be optimized to achieve this objective.

Key words: MALDI-TOF; *Aeromonas*, *E. coli*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESPECTROS OBTIDOS PARA AS REPLICATAS TÉCNICAS DE <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	36
FIGURA 2 – ESPECTROS DE MASSA CARGA (M/Z) DE ESPÉCIES DE <i>Aeromonas</i> ANALISADAS.....	39
FIGURA 3 – DENDROGRAMA GERADO COM OS RESULTADOS DE MALDI-TOF DAS ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> E GRUPO EXTERNO. ....	42
FIGURA 4 – ESPECTROS DE MASSA CARGA (m/z) DAS CATEGORIAS DE <i>E. coli</i> ANALISADAS.....	44
FIGURA 5 – DENDROGRAMA GERADO COM OS RESULTADOS DE MALDI-TOF DAS ESTIRPES DE <i>E.coli</i> .....	51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> spp. ANALISADAS .....	30
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i> ANALISADOS .....	31
TABELA 3 – FREQUÊNCIA E REPRODUTIBILIDADE DOS PICOS M/Z DE <i>E. coli</i> ATCC 25922 POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF .....	37
TABELA 4 – FREQUÊNCIA DE PICOS DE MASSA CARGA (M/Z) ENTRE ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> spp E GRUPO EXTERNO.....	40
TABELA 5 – FREQUÊNCIA DE MASSAS-CARGAS (M/Z) ENTRE ESTIRPES DE <i>E. coli</i> E GRUPO EXTERNO.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S <i>rRNA</i>	- Gene codificador do RNA ribossomal 16S
A/E	- Lesão característica denominada attaching and effacing
aEPEC	- <i>E. coli</i> enteropatogênica atípica
Arb	-Unidade arbitrária
BFP	- <i>bundle-forming pilus</i>
Da	- Unidade Dalton
DAEC	- <i>E. coli</i> de aderência difusa
DEC	- <i>E. coli</i> patogênicas intestinais ou diarreogênicas
EAEC	- <i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	- <i>E. coli</i> enteroinvasora
EPEC	- <i>E. coli</i> enteropatogênica clássica
ETEC	- <i>E. coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	- <i>E. coli</i> patogênicas extra-intestinais
cGMC	- Guanina monofosfato cíclico
<i>gyrB</i>	- Gene codificador da sub-unidade B da DNA girase
HCCA	- ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
HGs	- Grupos de Hibridização
ITU	- Infecção do trato urinário
LEE,	-Locus of Enterocyte Effacement
MALDI-TOF	- <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
MNEC	- <i>E. coli</i> associada com meningite/sepse
m/z	- Relação massa/carga
NaCl	- Cloreto de sódio
O/129	- 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina (agente vibriostático)
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i>
PTT	- Púrpura Trombocitopênica Trombótica
<i>rpoD</i>	- Gene codificador da sub-unidade sigma D da RNA Polimerase
SUH	- Síndrome Urêmico-Hemolítica
STEC	- <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
T3SS	- Sistema de Secreção Tipo Três
UPEC	- <i>E. coli</i> uropatogênica

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	12
2.1	<i>Aeromonas</i> .....	12
2.1.1	Infecções causadas por <i>Aeromonas</i> spp. ....	13
2.2	<i>Escherichia coli</i> .....	15
2.2.1	Patotipos de <i>E. coli</i> .....	16
2.2.1.1	<i>E. coli</i> Associada com Meningite e Sepsis (MNEC) .....	16
2.2.1.2	<i>E. coli</i> Uropatogênica (UPEC) .....	16
2.2.1.3	<i>E. coli</i> Diarreogênicas (DEC).....	17
2.2.1.3.1	<i>E. coli</i> Enteropatogênica (EPEC) .....	18
2.2.1.3.2	<i>Escherichia coli</i> Shiga Toxigênica (STEC).....	19
2.2.1.3.3	<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	20
2.2.1.3.4	<i>E. coli</i> Enteroinvasora (EIEC).....	21
2.2.1.3.5	<i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAEC) .....	21
2.2.1.3.6	<i>E. coli</i> que Adere Difusamente (DAEC) .....	22
2.3	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i> e <i>E. coli</i> .....	23
2.4	DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	24
2.4.1	Métodos baseados na análise de DNA .....	24
2.4.2	Espectrometria de Massas tipo Matriz-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF MS) .....	25
3	OBJETIVOS .....	27
3.1	OBJETIVO GERAL .....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
4	JUSTIFICATIVA .....	28
5	MATERIAL E MÉTODOS .....	30
5.1	AMOSTRA .....	30
5.1.1	<i>Aeromonas</i> .....	30
5.1.2	<i>E. coli</i> .....	31
5.2	Espectrometria de Massa MALDI-TOF .....	32
5.2.1	Preparo da Amostra .....	32
5.2.2	Análise das amostras.....	33
5.2.3	Análise e Agrupamento dos espectros.....	34
6	RESULTADOS.....	35
6.1	ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF .....	35
6.1.1	Reprodutibilidade dos Espectros.....	35
6.1.2	Análise de <i>Aeromonas</i> spp. através de Espectrometria de Massa MALDI-TOF ...	38
6.1.3	<i>E. coli</i> .....	43
7	DISCUSSÃO .....	53
7.1	<i>Aeromonas</i> .....	54
7.2	<i>E. coli</i> .....	55
8	CONCLUSÃO .....	58
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

*Aeromonas* spp. são bacilos gram negativos, anaeróbios facultativos, que fermentam glucose, são citocromo oxidase-positiva e não esporulam (BRENNER *et.al.*, 2005). O seu habitat é aquático e são comumente encontradas em lagos, rios, reservatórios de água potável, águas subterrâneas, águas residuais e de esgoto, além de águas salgadas com baixa concentração de sal (HORNEMAN; ALI; ABBOTT, 2007).

Algumas espécies de *Aeromonas* são capazes de causar infecções em humanos, tanto em indivíduos imunodeprimidos quanto naqueles imunocompetentes (PARKER; SHAW, 2010). São capazes de causar infecções intestinais, variando de diarreia não complicada até casos mais graves com presença de sangue e muco nas fezes, e extra-intestinais como meningite, septicemia, infecções do trato respiratório, entre outras (JANDA; ABBOTT, 2010).

Estudos recentes apontam *Aeromonas* como um patógeno emergente e responsável por uma série de síndromes, especialmente em situações de desastres naturais, uma vez que bactérias desse gênero foram as mais comumente isoladas em sobreviventes do tsunami que assolou a Tailândia em 2004 (HIRANSUTHIKUL *et.al.*, 2005).

Embora várias espécies sejam patogênicas, *Aeromonas* não são pesquisadas rotineiramente nos laboratórios clínicos, o que dificulta a obtenção de dados epidemiológicos. Entre os fatores que complicam a identificação dessas bactérias estão o elevado número de grupos taxonômicos reconhecidos, e a necessidade de testes que não são utilizados na rotina dos laboratórios clínicos para diferenciá-las de outros grupos (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003).

Ainda há pouca informação sobre a importância dessas bactérias como agentes infecciosos no país (HOFER *et.al.*, 2006; GUERRA *et.al.*, 2007; CASTILHO *et.al.*, 2009). Um estudo recentemente realizado no Paraná mostrou que *Aeromonas* apresentam frequência similar a de outros enteropatógenos e são causa importante de diarreia no Estado (SUREK *et.al.*, 2010).

*Escherichia coli* são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, que fermentam glucose, são citocromo oxidase negativa e não esporulam. Estas estirpes comensais de *E. coli* raramente causam doença, exceto nos indivíduos

imunocomprometidos ou quando ocorre rompimento das barreiras gastrointestinais (NATARO *et.al.*, 2011).

No entanto existem várias estirpes de *E. coli* que adquiriram atributos específicos de virulência que lhes permitem colonizar outros sítios anatômicos e provocar um amplo espectro de doenças. Essas estirpes patogênicas (patotipos) podem ser classificadas em 2 grupos principais, as *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) e as *E. coli* patogênicas intestinais ou diarreogênicas (DEC), dependendo de onde elas causam infecção: dentro ou fora do trato intestinal (KAPER *et.al.*, 2004; NATARO *et.al.*, 2011).

Diferentemente do que ocorre com *Aeromonas*, as estirpes de *E. coli* são rotineiramente identificadas nos laboratórios clínicos. Entretanto, enquanto as ExPEC são facilmente isoladas e identificadas através de métodos microbiológicos convencionais, as DEC devem ser diferenciadas das estirpes comensais. Para isso são necessários testes moleculares, imunológicos e/ou ensaios celulares.

Este trabalho visa contribuir para a identificação de *Aeromonas* e *E. coli*, e para o conhecimento sobre a epidemiologia de *Aeromonas* no Paraná.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Aeromonas*

A evidência mais antiga documentada sobre a existência de *Aeromonas* data de 1891, quando este microorganismo foi isolado a partir do sangue e da linfa de um sapo infectado, recebendo a classificação de *Bacillus hydrophilus fuscus*. Em 1901 foi reclassificada como *Bacteria hydrophila*. Posteriormente foi classificada em diferentes gêneros, como *Aerobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* e *Vibrio*. Em 1936 foi proposta a classificação como *Aeromonas* (PERCIVAL *et.al.*, 2004).

O gênero *Aeromonas* foi inicialmente incluído na família *Vibrionaceae*. No entanto, análises de hibridização de DNA-DNA e seqüenciamento do 16S *rRNA* mostraram divergência evolutiva das *Aeromonas* em relação às famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, justificando assim a criação da família *Aeromonadaceae* (BRENNER *et.al.*, 2005).

Estudos posteriores revelaram a existência de múltiplos grupos de hibridização (HGs) em algumas espécies de *Aeromonas* (JANDA, 1991). Atualmente o gênero *Aeromonas* compreende 14 fenoespécies que correspondem a pelo menos 17 genomospécies (grupos de hibridização de DNA ou HG) (BRENNER *et.al.*, 2005).

*Aeromonas* spp. são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, oxidase e catalase positivas e reduzem nitrato a nitrito. São fermentadores de D-glucose, mas podem utilizar vários outros carboidratos (BRENNER *et.al.*, 2005). São bacilos com extremidades arredondadas, mas às vezes podem aparecer como cocobacilos ou formas filamentosas, podendo ocorrer isoladamente, em pares ou em cadeias. Produzem proteases, lipase, DNase e lecitinase. Não são halófilas e não crescem em 7,5% de cloreto de sódio (NaCl). Crescem em faixa de pH variando de 5,5 – 9,0 (KHARDORI; FAINSTEIN, 1988; BRENNER *et.al.*, 2005; HORNEMAN; ALI; ABBOTT, 2007).

De acordo com a temperatura ótima de crescimento *Aeromonas* spp. são subdivididas em mesófilas e psicrófilas. As primeiras incluem bactérias móveis, que apresentam temperatura ótima de crescimento entre 35 a 37°C, e máxima de 41°C. Essas estão associadas com uma variedade de infecções em humanos. Em contrapartida, as espécies psicrófilas incluem bactérias que causam doenças em

peixes e animais aquáticos, são imóveis e a temperatura ótima de crescimento é em torno de 22 a 25°C e a mínima é de 0 a 5°C (KHARDORI; FAINSTEIN, 1988; BRENNER *et.al.*, 2005; HORNEMAN; ALI; ABBOTT, 2007).

*Aeromonas* são encontradas em praticamente todo o meio ambiente, mas principalmente em ambientes aquáticos como rios, lagos, lagoas de água salgada, água potável, subterrânea, residuais e de esgoto (HORNEMAN; ALI; ABBOTT, 2007). Podem ser recuperadas a partir de água potável que atende aos padrões de qualidade para organismos indicadores (PABLOS *et.al.*, 2009). *Aeromonas* são também frequentemente recuperadas de vertebrados e outros hospedeiros podendo causar uma grande variedade de doenças, tanto em animais de sangue frio quanto de sangue quente (BRENNER *et.al.*, 2005).

Estes microorganismos também podem ser isolados a partir de vários alimentos (EVANGELISTA-BARRETO *et.al.*, 2006; GALINDO *et.al.*, 2006), o que sugere que a transmissão aos humanos ocorre através da ingestão de água e alimentos contaminados, uma vez que essas bactérias não pertencem a microbiota intestinal normal (JANDA; ABBOTT, 2010).

#### 2.1.1 Infecções causadas por *Aeromonas* spp.

As infecções causadas por *Aeromonas* podem ser divididas em quatro grandes categorias: síndromes do trato gastrointestinal, infecções de feridas e de tecidos moles, septicemia e diversos outros processos infecciosos que incluem uma infinidade de doenças menos frequentes (JANDA; ABBOTT, 1998; CHOPRA; HOUSTON, 1999; JANDA; ABBOTT, 2010) como infecções respiratórias, urinárias (AL-BENWAN *et.al.*, 2007), oculares (SOHN *et.al.*, 2007), e ósseas (GÓMEZ-GARCÉS *et.al.*, 2011).

Gastroenterite é o principal problema de saúde associado com *Aeromonas*, tanto em países industrializados como em nações em desenvolvimento, e abrange todos os grupos etários. Pode afetar indivíduos saudáveis e também pessoas que sofrem de doenças imunológicas (GASCÓN, 2006).

A gastroenterite causada por *Aeromonas* spp. pode apresentar diferentes quadros clínicos que variam em gravidade. O quadro mais comum é a diarreia aquosa, apresentação clínica observada em 75% a 89% dos casos de gastroenterite nos quais *Aeromonas* foi considerada o único agente patogênico. Os principais

sintomas incluem febre e dor abdominal, e a desidratação é tipicamente leve a moderada. A gastroenterite disentérica é muito menos comum (3% a 22%), e os sintomas incluem cólicas abdominais, sangue e muco nas fezes (CHOPRA; HOUSTON, 1999; VILA *et.al.*, 2003).

Os casos de diarréia subaguda apresentam duração variando de duas semanas a dois meses. Ocorrem múltiplas evacuações por dia, por vezes acompanhados de perda de peso significativa ao longo do tempo. Os casos crônicos estão associados com duração de meses ou até mesmo um ano e podem levar ao desenvolvimento de colite ulcerativa (JANDA; ABBOTT, 2010). Além disso, *Aeromonas* também é uma causa importante da diarréia do viajante (GALINDO *et.al.*, 2006).

O quadro mais grave associado à doença invasiva por *Aeromonas* é a septicemia. Pessoas imunodeprimidas, com risco de desenvolver doenças mieloproliferativas, ou com doenças crônicas do fígado, são populações de risco para o desenvolvimento desta forma de infecção (MENCACCI *et.al.*, 2003, TENA *et.al.*, 2007).

A sintomatologia de septicemia causada por *Aeromonas* não difere daquela provocada por outros microorganismos, e inclui febre (74% a 89%), icterícia (57%), dor abdominal (16% a 45%), choque séptico (40% a 45%) e dispnéia (12% a 24%). Pode ocorrer diarréia (9% a 14% dos casos) anterior ou concomitante com o aparecimento de bacteremia. O contato com água doce ou profissão associada a estes ambientes, como pesca, além de episódios traumáticos anteriores ao quadro séptico podem sugerir infecção por *Aeromonas* (JANDA; ABBOTT, 2010).

O segundo local anatômico mais comum a partir do qual as *Aeromonas* são isoladas, são os tecidos moles subjacentes à epiderme. As manifestações clínicas podem variar de quadros leves, como a celulite, lesões pustulares, a quadros graves como a fasciíte necrotizante que apresenta alta taxa de mortalidade (JANDA; ABBOTT, 2010).

Três espécies respectivamente, *A. hydrophila* (HG1), *A. caviae* (HG4) e *A. veronii* biovar sobria (HG8), representam mais de 85% dos isolados recuperados a partir de material clínico humano (JANDA, 1991; GALINDO *et.al.*, 2006; PARKER; SHAW, 2010).

Recentemente Martinez-Murcia e colaboradores (2008) utilizaram uma abordagem polifásica para o estudo de um grupo de bactérias identificadas como

*Aeromonas* às quais não foi possível atribuir uma espécie. Baseados nos resultados de análises filogenéticas derivadas do sequenciamento dos genes *gyrB*, *rpoD* e *16S rRNA*, e hibridização DNA-DNA, aqueles autores descreveram uma nova espécie para o gênero, *A. aquariorum*.

Esta bactéria pode ser encontrada em água de aquários e pele de peixes ornamentais, tem sido implicada em infecções humanas (FIGUERAS *et.al.*, 2009; ARAVENA-ROMÁN *et.al.*, 2011).

Um estudo recente, realizado na Austrália, mostrou que *A. aquariorum* foi a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas humanas e de água e que pode ser erroneamente identificada como *A. hydrophila* pelos métodos fenotípicos. Além disso, o estudo sugere que a elevada distribuição de *A. aquariorum* contradiz a noção amplamente aceita de que *A. caviae*, *A. hydrophila*, e *A. veronii* bv. sobria representam as espécies mais frequentemente isoladas de *Aeromonas* (ARAVENA-ROMÁN *et.al.*, 2011).

Entretanto há controvérsias quanto a proposta de *A. aquariorum* uma vez que esta nova espécie parece ser fenotípica e geneticamente idêntica a *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* proposta em 2002 e isolada de crianças com diarreia em Bangladesh (HORNEMAN e ALI, 2011).

## 2.2 *Escherichia coli*

*E. coli* são bacilos gram negativos que habitam o trato intestinal humano e de animais como comensais (NATARO *et.al.*,1998). Pertencem à família *Enterobacteriaceae* e como tal são anaeróbios facultativos, fermentam a glucose, são citocromo oxidase negativos, reduzem nitrato a nitrito e não esporulam (NATARO *et.al.*, 2011).

No entanto existem estirpes patogênicas de *E. coli* que são capazes de causar uma série de infecções em humanos (BOPP *et.al.*, 1999; KAPER *et.al.*, 2004). As estirpes patogênicas contêm características específicas de virulência e são agrupadas em 2 categorias amplas denominadas *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) e *E. coli* patogênicas intestinais ou diarreogênicas (DEC), dependendo do sítio anatômico onde causam infecção (NATARO *et.al.*, 2011).

### 2.2.1 Patotipos de *E. coli*

As ExPEC contém 2 patotipos (grupos patogênicos) reconhecidos: *E. coli* associada com meningite/sepsse (MNEC), causa de meningite neonatal associada com alta morbidade e mortalidade, e *E. coli* uropatogênica (UPEC) principal causa de infecção do trato urinário (ITU) adquirida na comunidade (KAPER *et.al.*, 2004; NATARO *et.al.*, 2011).

#### 2.2.1.1 *E. coli* Associada com Meningite e Sepsse (MNEC)

As estirpes de MNEC são a causa mais comum de meningite neonatal provocada por bactérias gram-negativas. A taxa de fatalidade é de 15 a 40% e deixa seqüelas neurológicas severas em muitos dos sobreviventes. A bactéria se difunde pela via hematogênica, e transloca do sangue para o sistema nervoso central (KAPER *et.al.*, 2004) invadindo as células endoteliais microvasculares do cérebro através de vacúolos ligados à membrana. Dentro dos vacúolos as bactérias evitam a fusão lisossomal e tem acesso ao sistema nervoso central sem causar dano aparente à barreira hemato-encefálica (NATARO *et.al.*, 2011).

Os genomas destes patotipos contêm genes adicionais que não estão presentes no genoma da *E. coli* comensal K-12. Fímbrias S, proteína de membrana externa OmpA, além de uma série de outras proteínas de membrana e da cápsula K1 são necessárias para o processo de invasão. (KAPER *et.al.*, 2004).

#### 2.2.1.2 *E. coli* Uropatogênica (UPEC)

As estirpes de UPEC são a principal causa de infecção do trato urinário adquirida na comunidade. Estas bactérias apresentam uma variedade de fatores de virulência, codificados no cromosso e em plasmídeos, que podem ser encontrados em diversas combinações, mas não há nenhum perfil fenotípico/genotípico único para definir as UPEC (NATARO *et.al.*, 2011; OLIVEIRA *et.al.*, 2011).

Os fatores de virulência de UPEC incluem adesinas, sideróforos, toxinas, antígenos polissacarídicos e capsulares. As adesinas do tipo 1, P (*pap*), S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afaI*) entre outras, são importantes para a colonização. Várias toxinas podem ser produzidas como por exemplo as hemolisinas (*hly*) e o fator

necrotizante citotóxico tipo 1 (*cnf1*) que provocam dano tecidual facilitando a disseminação bacteriana e liberando nutrientes (WILES *et.al.*, 2008).

Outros fatores como o sideróforo aerobactina (*aer*), e a resistência ao soro (*traT*) também desempenham um papel importante para a bactéria causar doença. Os sideróforos, sistemas para aquisição de ferro, são essenciais para a persistência da bactéria no trato urinário, um ambiente pobre em ferro. Já a resistência ao soro, a habilidade de evitar a atividade bactericida do soro, permite à bactéria persistir nos líquidos corpóreos e órgãos internos do hospedeiro (WILES *et.al.*, 2008).

Várias dessas características associadas com virulência são codificadas em ilhas de patogenicidade, que contem blocos de genes ausentes nas estirpes diarreogênicas e nas comensais (OELSCHLAEGGER *et.al.*, 2002).

### 2.2.1.3 *E. coli* Diarreogênicas (DEC)

As DEC podem ser classificadas em 7 categorias com base na patogênese, manifestações clínicas e a presença de fatores de virulência específicos: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC); *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (CROXEN; FINLAY, 2010).

Estas bactérias estão entre as causas mais importantes de diarreia, constituindo uma das principais causas de morbidade e mortalidade, e constituem um sério problema de saúde pública (NATARO, STEINER E GUERRANT, 1998). Os sintomas associados com as infecções causadas pelas DEC variam de diarreia aquosa auto-limitada a complicações extra intestinais como Síndrome Urêmico-Hemolítica (SUH) e Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) (PATON e PATON, 1998).

A transmissão das DEC ocorre via fecal-oral, através de mãos, fômites, alimentos e água contaminados (NATARO *et.al.*, 1998). Para a prevenção da infecção medidas de higiene e sanitárias devem ser adotadas, além da pasteurização e do cozimento adequado dos alimentos (GRIFFIN *et.al.*, 1998).

Devido à grande similaridade existente entre as *E. coli* comensais e as DEC, não é possível diferenciar esses organismos utilizando apenas os testes microbiológicos convencionais como a cultura e ensaios bioquímicos. Uma

metodologia comumente utilizada em laboratórios clínicos para identificar algumas estirpes de DEC é a classificação sorológica, que utiliza anticorpos contra antígenos de superfície (SILVA, 2006).

A sorologia define o sorogrupo (antígeno somático “O”) ou sorotipo (antígenos somático “O” e flagelar “H”) de uma estirpe, mas raramente os marcadores sorotípicos são suficientes para identificar uma estirpe como DEC de forma confiável uma vez que não há relação entre estes e virulência (NATARO e KAPER, 1998, PIAZZA *et.al.*, 2010).

Somente as propriedades de virulência permitem distinguir entre as estirpes de DEC e as demais *E. coli* (TSCHÄPE *et.al.*, 2001). Atualmente podem ser usados ensaios moleculares, como hibridização do DNA ou Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), imunológicos e/ou cultivo celular (NATARO *et.al.*, 1998). Estes métodos permitem detectar a presença de características fenotípicas ou de genes associados diretamente à patogênese e permitem diferenciar as DEC das *E. coli* da microbiota intestinal, e diferenciar os diversos patotipos (SALYERS e WHITT, 2002).

#### 2.2.1.3.1 *E. coli* Enteropatogênica (EPEC)

EPEC é a principal causa de diarreia em crianças menores de dois anos (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002; CROXEN; FINLAY, 2010). A infecção causada por este patógeno é caracterizada por diarreia aquosa e profusa, vômito e febre baixa. As EPECs são classificadas em dois tipos: as típicas e as atípicas. As primeiras possuem o gene *eae* e o plasmídeo de virulência EAF, simultaneamente, enquanto as EPECs atípicas (aEPEC) possuem apenas o gene *eae* (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

Durante o Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC essas bactérias foram definidas como “estirpes diarreiogênicas de *E. coli* que produzem uma lesão característica denominada *attaching and effacing* (A/E) nas células intestinais e que não produzem toxinas Shiga. As EPEC típicas de origem humana possuem o plasmídeo de virulência EAF que codifica o *bundle-forming pilus* (BFP), necessário para a adesão localizada (LA) em células epiteliais, e um complexo regulador de vários genes de virulência, enquanto as EPEC atípicas (aEPEC) não possuem este plasmídeo” (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

A formação de lesão do tipo A/E (*attaching and effacing*) na mucosa intestinal, leva à má absorção dos nutrientes (FAGUNDES NETO, 1996). Resulta da capacidade da bactéria em aderir aos enterócitos, destruir as microvilosidades (CROXEN; FINLAY, 2010) e induzir alterações no citoesqueleto (DONNENBERG *et.al.*, 2001). A formação desta lesão depende da expressão de vários genes localizados em uma região do cromossomo da EPEC denominado *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE), esta região não é encontrada em estirpes não patogênicas de *E. coli* (DONNENBERG *et.al.*, 2001).

Um dos fatores de virulência codificados na LEE que contribuem para causar a lesão A/E é a Intimina, codificada pelo gene *eae* (JERSE *et.al.*, 1990). Esta proteína é responsável pela íntima adesão das EPECs às células epiteliais.

As EPECs exibem um padrão de aderência característico em células HeLa e Hep-2, que é dependente da presença do plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*). Nessas células, as EPECs se ligam a superfície celular formando grumos compactos, que caracterizam o padrão de aderência localizada (LA) (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002). Esta é dependente da presença de um tipo de pili denominado *bundle-forming pilus* (BFP), codificado no plasmídeo EAF, que interconecta as bactérias promovendo sua estabilização (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

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 TARDELLI GOMES, 2002). No Brasil até a década de 90 era observada alta frequência de EPEC típica, no entanto, estudos recentes demonstram prevalência das aEPEC (FRANZOLIN *et.al.*, 2005; BUERIS *et.al.*, 2007; FIALHO, 2008; LIEBCHEN *et.al.*, 2011).

#### 2.2.1.3.2 *Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC)

*Escherichia coli* Shiga Toxigênica (STEC) são patógenos capazes de causar surtos e casos isolados de infecções em humanos, que variam desde diarreia branda, colite hemorrágica até complicações como Síndrome Urêmica-Hemolítica (SUH) e Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) (PATON e PATON, 1998).

Seu principal reservatório é o intestino do gado bovino aparentemente saudável. Assim, os surtos de doença provocados por STEC têm sido associados principalmente à ingestão de carne bovina mal assada e leite cru contaminados, além de produtos industrializados como queijo e salsichas (WHO, 1998).

A toxina Shiga é o principal fator de virulência das STEC. Existem dois tipos principais dessas toxinas, que são denominadas toxina Shiga1 (Stx1) e toxina Shiga 2 (Stx2), codificadas pelos genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>, respectivamente (NATARO; KAPER, 1998).

As STEC podem conter um ou mais desses genes, que são codificados em bacteriófagos inseridos no cromossomo da bactéria. Enquanto *stx*<sub>1</sub> ou a associação *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub> são mais comumente encontradas nas estirpes de STEC isoladas de casos de diarreia ou colite hemorrágica, a presença de *stx*<sub>2</sub> isoladamente é considerada o fator mais importante associado com o desenvolvimento de formas mais graves de doença em humanos (BOERLIN *et.al.*, 1999). Após a ligação aos receptores do tipo Gb3, a toxina é internalizada e provoca morte celular (PATON e PATON, 1998).

As STEC podem apresentar outros fatores de virulência que estão distribuídos de forma heterogênea entre as diferentes estirpes, e que aumentam sua virulência (KARCH *et.al.*, 1999; KAPER *et.al.*, 2004), dentre eles a intimina, também presente nas EPEC e aEPEC, e enterohemolisina, codificada pelo gene *ehxA*, que pode ser produzida por algumas estirpes de STEC (BOERLIN *et.al.*, 1999).

#### 2.2.1.3.3 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

As ETEC são estirpes de *E.coli* associadas com surtos de diarreia nos países em desenvolvimento e são a principal causa da “diarreia do viajante”, podendo ser fatal em crianças menores de 5 anos (NATARO *et.al.*, 2007; CROXEN; FINLAY, 2010). A diarreia se caracteriza por ser aquosa, com diferentes níveis de gravidade (QUADRI *et.al.*, 2005).

As ETECs são caracterizadas pela produção das toxinas termo-lábil (LT) e termoestável (ST), que podem ser expressas isoladamente ou concomitantemente. A toxina termolábil está relacionada em estrutura e função com a toxina produzida pelo *Vibrio cholerae* (QUADRI *et.al.*, 2005). Esta toxina provoca um aumento nos níveis de AMPc intracelular, o que causa secreção de íons e fluido na luz intestinal, gerando diarreia (KAPER *et.al.*, 2004).

A toxina termo estável STa, mais fortemente associada a quadros de infecções em humanos, liga-se ao receptor guanilato ciclase C, resultando em aumento dos níveis de guanina monofosfato cíclico (cGMP) intracelular, provocando aumento dos níveis de cloreto e inibição da absorção de sódio, causando hipersecreção de água e íons, levando ao quadro de diarreia (VAANDRAGER, 2002).

As ETECs podem ainda possuir os antígenos de fator de colonização (CFA), que favorecem a adesão aos enterócitos e cujos genes estão localizados em plasmídeos que também codificam as toxinas ST e LT (NATARO e KAPER, 1998).

#### 2.2.1.3.4 *E. coli* Enteroinvasora (EIEC)

As EIECs causam principalmente diarreia aquosa, mas alguns casos podem evoluir para disenteria severa (NATARO e KAPER 1998). Estas bactérias são estritamente relacionadas com *Shigella*, organismo com o qual possuem estreita relação bioquímica, genética e patogênica (KAPER *et.al.*, 2004; CROXEN; FINLAY, 2010).

A virulência desses organismos é devida em grande parte a um plasmídeo de virulência que codifica um Sistema de Secreção Tipo Três (T3SS), locus Mxi-Spa, que é necessário para a invasão, seu principal mecanismo de patogenicidade (CROXEN; FINLAY, 2010). Os genes *ipa* e *ial*, associados com o T3SS, tem sido empregados como marcadores para a detecção dessas bactérias (LOPEZ-SAUCEDO *et.al.*, 2003; ARANDA *et.al.*, 2004).

#### 2.2.1.3.5 *E. coli* Enteroagregativa (EAEC)

As EAEC são caracterizadas pelo padrão de adesão agregativo em células Hep-2 ou HeLa, mediado pelas fímbrias de aderência agregativa (AAFs) (KAPER *et.al.*, 2004; CROXEN; FINLAY, 2010). O seu principal mecanismo de virulência consiste na colonização da mucosa intestinal. Uma vez instalada no intestino, a bactéria libera enterotoxinas e citotoxinas que são responsáveis pela lesão da mucosa e pela diarreia do tipo secretória (NATARO *et.al.*, 1998). A habilidade de causar diarreia aguda, persistente, se deve a secreção de muco, que envolve a

EAEC formando um biofilme composto por agregados de bactéria em associação com uma camada espessa de muco (NATARO e KAPER, 1998).

Nenhum fator de virulência isoladamente foi associado a EAEC, e a capacidade da bactéria causar doença provavelmente envolve a participação de vários fatores, de origem plasmidial e cromossomal (HARRINGTON *et.al.*, 2006). Este grupo de bactérias provavelmente engloba estirpes patogênicas quanto não-patogênicas (ELIAS *et.al.*, 2002). Entretanto ao menos um sub-grupo é comprovadamente patogênico para humanos, e vem sendo crescentemente reconhecido como causa de diarreia aguda persistente, em crianças e adultos (KAPER *et.al.*, 2004).

Um marcador utilizado para a detecção de EAEC é a presença do plasmídeo de aderência agregativa (pAA), também chamado de CVD432. Este plasmídeo codifica as fimbrias de aderência agregativa (AAF-I e II), que permitem à bactéria aderir a células HEp-2 e a mucosa intestinal (CZECZULIN *et.al.*, 1997), além do ativador transcricional *aggR* que tem sido utilizado como um marcador para as estirpes patogênicas (NATARO *et.al.*, 1994; KAPER *et.al.*, 2004).

#### 2.2.1.3.6 *E. coli* que Adere Difusamente (DAEC)

As DAECs são caracterizadas pelo padrão de aderência difuso (DA) às células HEp-2, no qual as bactérias se distribuem uniformemente sobre a superfície celular (NATARO e KAPER, 1998). Este padrão de adesão é mediado por adesinas fimbriais (F1845 e Dr), e não fimbriais (AfaE-I e AfaE II) (LE BOUGUENEC, *et.al.*, 2006).

O mecanismo de virulência das DAECs ainda não está bem esclarecido (CROXEN; FINLAY, 2010). Sabe-se que essas bactérias são capazes de provocar lesões nas microvilosidades e induzir o desenvolvimento de extensões celulares longas que envolvem a bactéria (BERNET-CAMARD *et.al.*, 1996), além de provocarem reação inflamatória no epitélio intestinal.

A patogênese de DAEC parece ser predominantemente mediada pelas interações entre as adesinas Afa-Dr com as células hospedeiras (CROXEN; FINLAY, 2010).

### 2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR ESTIRPES DE *Aeromonas* E *E. coli*

No laboratório clínico rotineiramente a identificação bacteriana é baseada na realização de exames microscópicos, sendo a coloração de Gram a mais comum, e no cultivo do microorganismo e sua caracterização bioquímica com base em critérios fenotípicos (JANNES e VOS, 2006).

*Aeromonas* são quimioorganotróficas e possuem tanto metabolismo fermentativo quanto respiratório. Não são fastidiosas e podem ser cultivadas em ágar sangue e em vários meios de cultura para o isolamento de organismos entéricos. As colônias positivas para o ensaio de oxidase, devem ser submetidas às provas de fermentação da glucose e crescimento em NaCl com concentrações variando de 0 a 6%, produção de gás a partir da glucose, fermentação de L-arabinose, fermentação do glicerol, fermentação de D-manitol, fermentação de sacarose, utilização de citrato, hidrólise da gelatina, esculina, resistência ao agente vibriostático O129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina), produção de indol e Voges-Proskauer (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003).

Outros açúcares podem ser utilizados para a identificação tais como: glucose, frutose, maltose e trealose (KHARDORI; FAINSTEIN, 1988). Não são capazes de utilizar xilose, sorbose, eritritol, adonitol, dulcitol; não produzem H<sub>2</sub>S em quando cultivadas em meio Kligler iron agar (KIA) (PARKER; SHAW, 2010).

A identificação de *Aeromonas* spp. há muito tempo tem gerado controvérsias devido à sua heterogeneidade fenotípica. Diversas abordagens foram feitas para caracterizá-las, mas apesar do empenho, a identificação de algumas espécies continua sendo um sério problema devido aos testes bioquímicos convencionais não serem sempre confiáveis e de não haver ainda uma diferenciação clara entre os grupos genéticos e fenotípicos (FIGUERAS, 2000). Segundo Aravena-Román e colaboradores (2011) a identificação acurada de *Aeromonas* ao nível de espécie utilizando apenas testes bioquímicos não é confiável.

Diferentemente do que ocorre com *Aeromonas*, bactérias pertencentes à espécie *E. coli* são facilmente isoladas e identificadas nos laboratórios clínicos utilizando meios de cultura como ágar sangue e ágar MacConkey, e testes bioquímicos convencionais (SILVA, 2006). Entretanto, a diferenciação entre as estirpes de *E. coli* comensais e os patótipos de DEC requer a utilização de testes

moleculares, imunoenaios e cultivo celular (NATARO e KAPER, 1998, PIAZZA *et.al.*, 2010), recursos que geralmente não estão disponíveis nos laboratórios de rotina.

## 2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### 2.4.1 Métodos baseados na análise de DNA

A identificação baseada nos métodos moleculares pode ser utilizada para definir gêneros ou espécies, além de estabelecer relações filogenéticas e a pesquisa de fatores de virulência (JANNES e DE VOS, 2006).

A identificação fenotípica de *Aeromonas* ao nível de espécie é considerada difícil devido a falta de uma clara diferenciação fenotípica, além de descrições pobres quanto à caracterização bioquímica das novas espécies (PABLOS *et.al.*, 2009). Atualmente diversas técnicas moleculares estão disponíveis para a identificação de *Aeromonas* (PARKER; SHAW, 2010).

BORRELL e colaboradores (1997) propuseram um método rápido para a identificação das espécies de *Aeromonas* baseado nos padrões de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) do gene 16S rRNA. Esta metodologia fornece informações sobre sítios que apresentam polimorfismos no gene rRNA16S, permitindo a determinação da espécie em curto período de tempo e com bom custo-benefício, pois permite identificação rápida e confiável. O seqüenciamento dos genes 16S rRNA (MARTINEZ-MURCIA *et.al.*, 1992), *rpoD* e *gyrB* (SOLER *et.al.*, 2004), também tem sido utilizado para a identificação de *Aeromonas*.

Um método alternativo para a rápida identificação bacteriana é a Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), largamente utilizada. Esta técnica é altamente sensível e apresenta várias vantagens como a identificação de patógenos de crescimento lento, além dos não cultiváveis, e fornece os resultados em pouco tempo (CARBONNELLE *et.al.*, 2011).

Os métodos moleculares tem sido crescentemente utilizados para o diagnóstico das infecções causadas pelas DEC, e diversos sistemas de PCR-multiplex estão descritos na literatura para esse fim (ARANDA *et.al.*, 2004; FIALHO, 2008; GUION *et.al.*, 2008). Esses ensaios baseiam-se na detecção e amplificação

de genes de virulência específicos de cada patotipo de DEC, permitindo um diagnóstico rápido e acurado.

#### 2.4.2 Espectrometria de Massas tipo Matriz-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF MS)

A Espectrometria de Massa (MS) é uma metodologia capaz de determinar a relação entre massa e carga ( $m/z$ ) de moléculas ionizadas em fase gasosa. Basicamente, o espectrômetro de massa é um equipamento constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (CANTÚ e CARRILHO, 2008).

Uma das fontes de ionização empregadas em MS é a *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI), que ioniza as moléculas de forma branda, preservando a estrutura polipeptídica, e transfere as moléculas a serem analisadas para a fase gasosa (CANTÚ e CARRILHO, 2008).

Basicamente, a amostra é colocada juntamente com uma matriz, sobre uma placa de metal e seca ao ar. A matriz e a amostra do analito co-cristalizadas são então colocadas no interior do equipamento e bombardeadas com laser. A matriz absorve os ftons e os transfere à amostra, o que leva à vaporização e ionização da amostra. Geralmente as moléculas são ionizadas com uma única carga. Como os analisadores separam as moléculas pela razão massa/carga, espectros relativamente simples são gerados devido à ionização branda pelo MALDI-TOF, que produz menor fragmentação dessas biomoléculas em comparação com outras técnicas de ionização (DARE, 2006; FOX, 2006; VANDAMME, 2007). Assim, o espectrômetro de massa primeiro ioniza, então separa os produtos e finalmente detecta os íons associados com o analito produzindo um espectro de massas.

Além disso, o espectro obtido é bastante reprodutível, o que aliado à simplicidade e rapidez da metodologia, tem contribuído para tornar o MALDI-TOF MS popular entre os microbiologistas (SAENZ *et.al.*, 1999; DARE, 2006; FOX, 2006; VANDAMME, 2007; SEIBOLD *et.al.*, 2010; van VEEN *et.al.*, 2010).

A espectrometria de massas tipo MALDI-TOF vem sendo crescentemente utilizada para a identificação de microorganismos ao nível de gênero, espécie e estirpe (CARBONNELLE *et.al.*, 2011; DEKKER e BRANDA 2011; MURRAY, 2010; SAUER e KLIEM, 2010). Tem sido aplicada para a análise de células bacterianas

íntegras, bem como de extratos preparados a partir das colônias bacterianas (BÖHME, et. al, 2010).

Os biomarcadores bacterianos mais frequentemente analisados pelo MALDI-TOF são proteínas, embora existam relatos de análises de DNA e RNA (LAY, 2001).

Cada molécula detectada é caracterizada de acordo com a massa molecular (m) e a carga (z), a razão massa/carga (m/z) e a intensidade relativa de sinal (CARBONNELLE, et.al., 2011; SAUER e KLIEM, 2010).

O espectro detectado é único para cada microorganismo analisado, com vários picos que correspondem as proteínas mais abundantes como as proteínas ribossomais e “*heat shock*” (DEKKER e BRANDA 2011; SAUER e KLIEM, 2010). Os espectros têm sido amplamente estudados, a fim de estabelecer padrões para diferentes espécies e possibilitar a identificação bacteriana (BÖHME et.al., 2010; LAY, 2001).

O MALDI-TOF está sendo apontado como um potencial substituto para as metodologias atualmente utilizadas na rotina laboratorial (BIZZINI *et.al.*, 2010; BIZZINI e GREUB, 2010). Esta técnica permite que a identificação bacteriana seja realizada em poucos minutos, ao contrário das técnicas de microbiologia clássica, baseadas na cultura de microorganismos, que podem requerer vários dias para a obtenção do resultado. Também apresenta vantagens em relação aos métodos moleculares, como a simplicidade do preparo da amostra, menor custo e a rapidez na obtenção do resultado. Além disso o MALDI-TOF é extremamente sensível, podendo detectar um sinal gerado de uma amostra que contém cerca de  $10^4$  a  $10^7$  células bacterianas (DEMIREV e FENSELAU, 2008; SAUER et.al., 2008).

Assim a tecnologia de MALDI-TOF tem o potencial para se tornar o método de escolha em microbiologia clínica, fornecendo resultados precisos e rápidos (BÖHME et.al., 2010; CHERKAOUI et.al., 2010; DEKKER e BRANDA 2011; WEILE e KNABBE, 2009). O tempo de análise é inferior a 5 minutos por amostra, para ensaios com células íntegras. Além disso, a metodologia pode ser automatizada (DONOHUE et.al., 2006; WEILE e KNABBE, 2009) é custo-eficiente (CHERKAOUI et.al., 2010; DEKKER e BRANDA 2011; WEILE e KNABBE, 2009; JANNES e DE VOS, 2006), sendo que cada análise pode custar cerca de um quarto do valor das metodologias convencionais (BIZZINI e GREUB, 2010) e o preparo da amostra é simples (DONOHUE et.al., 2006).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar estirpes de *Aeromonas* spp. e *Escherichia coli* através de Espectrometria de Massa MALDI-TOF e verificar o potencial dessa metodologia para discriminar essas bactérias.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar estirpes de *Aeromonas* spp utilizando espectrometria de massa tipo MALDI-TOF.

- Definir os picos de massas marcadores de *Aeromonas*

- Verificar se a espectrometria de massa tipo MALDI-TOF permite distinguir as espécies de *Aeromonas*.

- Caracterizar estirpes comensais e patogênicas de *E. coli* por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF.

- Definir os picos de massas marcadores de *E. coli*

- Verificar se a espectrometria de massa tipo MALDI-TOF permite distinguir as estirpes comensais e patogênicas de *E. coli*.

## 4 JUSTIFICATIVA

*Aeromonas* são ubíquas no ambiente, podendo ser isoladas de qualquer nicho ambiental onde exista um ecossistema bacteriano e principalmente de ambientes aquáticos. Isto também facilita a contaminação de alimentos que se tornam uma fonte potencial de infecção (CHOPRA; HOUSTON, 1999). Essas bactérias são capazes de causar um grande espectro de doenças intestinais e extra-intestinais (BRENNER *et.al.*, 2005; JANDA; ABBOTT, 2010).

A identificação de *Aeromonas* no laboratório clínico é dificultada por requerer a realização de um grande número de testes, alguns não utilizados na rotina, a taxonomia complicada, a falha na identificação dessas bactérias por alguns sistemas de identificação bacteriana comerciais, e de estirpes com perfis bioquímicos atípicos (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003; SUREK *et.al.*, 2010).

A taxa de incidência de infecções causadas por *Aeromonas* é desconhecida, pois não precisa ser obrigatoriamente reportada, o que dificulta a obtenção de dados epidemiológicos (JANDA; ABBOTT, 2010). No Brasil poucos são os dados disponíveis sobre infecções causadas por estes microorganismos. No Paraná, um estudo desenvolvido por SUREK e colaboradores (2010) encontrou uma prevalência de 2,7% de *Aeromonas* entre pacientes ambulatoriais com diarreia, reforçando a necessidade de estudos para a melhor caracterização deste patógeno. Além disso, até o momento inexistem no país estudos empregando métodos moleculares para o estudo da epidemiologia de *Aeromonas*.

Pela relevância para a saúde pública, é importante o desenvolvimento de métodos mais simples e confiáveis para a identificação de *Aeromonas* e a realização de estudos epidemiológicos, o que pode auxiliar nas medidas de controle e de tratamento das patologias causadas por estes microorganismos.

*E. coli* são bactérias comensais no intestino, onde são benéficas aos hospedeiro. No entanto, existem várias estirpes de *E. coli* que são capazes de causar uma série de infecções em humanos. *E. coli* são rotineiramente isoladas e identificadas no laboratório clínico, mas para isso, após a cultura primária, são requeridos vários testes microbiológicos (NATARO *et.al.*, 2011), o que acarreta em maior tempo para a sua identificação e implica em custos de meios de cultura e reagentes.

Além disso, as estirpes diarreogênicas de *E. coli* são bioquimicamente similares às encontradas como comensais no intestino. Estas formas de *E. coli* não podem ser distinguidas através dos métodos microbiológicos convencionais (NATARO *et.al.*, 1998). Para isso, são requeridos ensaios moleculares, imunológicos ou cultivo celular (PIAZZA *et.al.*, 2010).

O desenvolvimento de métodos mais rápidos, acurados e custos-efetivos para a identificação dessas bactérias terá um impacto importante na área de microbiologia e será benéfico para a saúde humana.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 AMOSTRA

#### 5.1.1 *Aeromonas*

Foram analisadas 97 estirpes de *Aeromonas spp.* previamente isoladas, e identificadas através de métodos bioquímicos e *Randon Fragment Length Polymorphism* (RFLP) de *16S rRNA*, mantidas na bacterioteca no Laboratório de Bacteriologia Clínica da UFPR. Setenta e cinco dessas estirpes foram isoladas no Estado do Paraná durante os anos de 1999 a 2009, a partir de fezes de pessoas com diarreia (73 estirpes), bacteremia e meningite (1 estirpe cada, respectivamente 49H e 1999) (VIZZOTTO, 2009; SUREK e colaboradores, 2010).

Outras 22 estirpes foram gentilmente cedidas por Flávia E. A. Assis, Bruno S. Vizzotto e pelo Laboratório Municipal de Curitiba. Destas bactérias, 3 foram isoladas de secreções de feridas (estirpes F1, F2 e F3) e as demais de fezes de pessoas com diarreia (TABELA 1). Como referências foram utilizadas as estirpes de *A. caviae* ATCC 14486 e *A. hydrophila* ATCC 7926. Como grupo externo foram utilizadas *Salmonella enterica* BAA-664 e *E. coli* ATCC 25922.

TABELA 1 – ESTIRPES DE *Aeromonas spp.* ANALISADAS

Espécie	N	Estirpes	Fonte
<i>A.veronii</i> bv <i>sobria</i>	14	20, 26, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 51, 55m, 70 e 312m	SUREK <i>et.al.</i> , 2010 VIZZOTTO não publicado
<i>A.trota</i>	03	2, 7 e 1999	VIZZOTTO não publicado
<i>A.hydrophila</i>	13	5Lm, 27Lm, 42m, 44, 60, 63, 92c, 93c, Lc15, LC81,Lc121,F3	ASSIS não publicado VIZZOTTO não publicado
<i>A.caviae</i>	60	Lc1, 4, 6, 8,9, 42, 43, 45,46, 47, 50, 53, 55, 56, 59, 61, 61m, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 84-85b, 85m, 92m, 96c, 97c, 252c, 359m, 423m, 507m, 547m e 594m	SUREK <i>et.al</i> , 2010; VIZZOTTO não publicado
<i>Aeromonas spp.</i>	07	3m, 19, 49, 49H, 68Lm, F1, F2, KRL	ASSIS não publicado; VIZZOTTO não publicado

### 5.1.2 *E. coli*

Foram analisadas 135 estirpes de *E. coli*, incluindo comensais (isolados fecais caracterizadas pela ausência de genes de virulência associados com as estirpes diarreogênicas) e patótipos isolados de infecções em humanos e STEC de origem bovina. Essas bactérias fazem parte da Bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica, e foram previamente identificadas, caracterizadas bioquimicamente e tipadas para a presença de genes de virulência característicos de cada grupo (TABELA 2).

Como referência foram incluídas no estudo *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* DH10B, *E. coli* IAL 307 (O124:K72, EIEC), *E. coli* IAL 2391 (EAEC), *E. coli* C1845 (DAEC), *E. coli* E2348/69 (EPEC) e *E. coli* EDL 933 (STEC). Como grupo externo foram utilizadas *A. cavie* ATCC 14486 e *Salmonella enterica* BAA-664.

As bactérias foram mantidas em TSB/glicerol 20% a -20°C.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS DE *E. coli* ANALISADOS

<i>E. coli</i> (N)	Estirpes	Características	Fonte
DAEC (2)	77cs, 133d	<i>daaE</i>	
EAEC (13)	18cs, 21cs, 66cs, 75d, 141d, 171d, 173cs, 179cs, 191cs, 217d, 226cs, 239d, 245d	CVD432	Fialho, não publicado.
EIEC (1)	29d	<i>ipaH, ial</i>	Fialho, não publicado.
aEPEC (29)	3cs, 28d, 49d, 65cs, 78cs, 85d, 86d, 94cs, 128cs, 132cs, 190d, 200d, 225cs, 213d, 216d, 1, 172, 173, 177, 329, 343, 348, 363, 366, 387, 405, 409, 410, 416	<i>eae</i>	Fialho, não publicado.
STEC			
Isolados humanos (5)	M03, 107cs	<i>stx<sub>1</sub></i>	Fialho, não publicado; De Toni <i>et.al.</i> , 2010.
	88cs, 150cs	<i>stx<sub>2</sub></i>	Fialho, não publicado;
	10d	<i>stx<sub>1</sub>, stx<sub>2</sub></i>	Fialho, não publicado;
Isolados de gado (16)	55, 9 <sub>1</sub> , 10, 95, 12, 58, 9 <sub>4</sub> , 22, 102, 86, 178 (O174:H21), 43 (ONT:H2), 39 (O113:H12), 47 (O22:H8)	<i>stx<sub>2</sub></i>	Farah <i>et.al.</i> , 2007; Pigatto <i>et.al.</i> , 2008
	65 <sub>1</sub> , 56	<i>stx<sub>1</sub>, stx<sub>2</sub></i>	Fialho, não publicado
Comensal (24)	100c, 119c, 30Lm, 31Lm, 32Lm, 29Lm, 19Lm, 35Lm, 124c, 181, 183, 184, 185,	Nenhum dos genes de	Fialho, não publicado

<i>E. coli</i> (N)	Estirpes	Características	Fonte
UPEC (45)	190, 196, 200, 203, 204, 205, 209, 211, 217, 218	virulência de DEC testados	Oliveira <i>et.al.</i> , 2011
	UPEC16,UPEC54, UPEC55, UPEC64, UPEC65, UPEC66, UPEC70, UPEC79	<i>traT</i>	
	UPEC2	<i>aer</i>	
	UPEC9	<i>pap</i>	
	UPEC19	<i>traT, pap, aer</i>	
	UPEC59, UPEC67, UPEC69, UPEC78, UPEC86	<i>traT, aer</i>	
	UPEC26,UPEC58,UPEC77	<i>traT,sfa</i>	
	UPEC21, UPEC80	<i>traT, pap, sfa, cnf1</i>	
	UPEC22	<i>traT, PAI, pap, sfa, cnf1</i>	
	UPEC56, UPEC60, UPEC72, UPEC75, UPEC85	<i>traT, PAI</i>	
	UPEC29	<i>PAI, sfa</i>	
	UPEC63	<i>traT, afa, era</i>	
	UPEC5	<i>pap, sfa, cnf1</i>	
	UPEC61	<i>traT, PAI, pap</i>	
	UPEC57	<i>traT, PAI, sfa</i>	
	UPEC68, UPEC74	<i>traT, PAI, pap, aer</i>	
	UPEC71	<i>traT, PAI, afa, aer</i>	
	UPEC76	<i>traT, afa, aer</i>	
	UPEC73	<i>traT, sfa, aer, cnf1</i>	
	UPEC15, UPEC20, UPEC27, UPEC 28, UPEC3, UPEC62, UPEC7, UPEC82	Nenhum dos genes de virulência de UPEC testados	

## 5.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

### 5.2.1 Preparo da Amostra

As bactérias foram cultivadas em ágar MacConkey por 16 a 18 horas, em aerobiose e temperatura de  $36\pm 1^\circ\text{C}$ . Colônias isoladas (~10 colônias, ~2mm diâmetro) foram transferidas para tubos plásticos e as células lavadas com 1 mL de água, centrifugadas a 25.000 *g* por 2 minutos e o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido uma vez. A seguir, o sedimento foi adicionado de 1 mL de etanol 75% (v/v), incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e então

centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco em estufa a  $36\pm 1^\circ\text{C}$ , e então ressuspensão em ácido fórmico 70% em acetonitrila (1:1).

Os extratos foram centrifugados a  $25.000\times g$  por 2 minutos e  $1\mu\text{L}$  dos sobrenadantes depositados sobre uma placa para análise no espectrômetro de massa e secos ao ar em temperatura ambiente. Então  $1\mu\text{L}$  da matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/ml) dissolvida em acetonitrila:ácido trifluoroacético 2,5% (1:1) foi adicionado às amostras e seco ao ar (SAUER *et.al.*, 2008). As amostras foram analisadas no laboratório do grupo de Fixação de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

### 5.2.2 Análise das amostras

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF-MS (Autoflex; Bruker Daltonics) equipado com um laser de nitrogênio (337nm) (Bruker Daltonics). Os íons positivos foram obtidos utilizando uma aceleração de 20Hz no modo linear.

Os espectros resultaram da soma dos íons obtidos de 100 tiros do laser em 10 posições diferentes da amostra aplicada num mesmo *spot*. A aquisição dos espectros foi realizada de forma manual com uma resolução mínima de 600 arb e máxima de 1500 arb e analisados em uma faixa de relação carga/massa ( $m/z$ ) de 3.000 a 20.000 Da.

Como calibrador foi utilizada uma mistura de insulina (M+H) (5734,52000  $m/z$ ), ubiquitina I (M+H) (8565,7600  $m/z$ ), citocromo C (M+2H) (6181, 05000  $m/z$ ), citocromo (M+H) (12360,97000  $m/z$ ), mioglobina (M+2H) (8476,6600  $m/z$ ) e mioglobina (M+H) (16952,31000  $m/z$ ) (Protein Calibration Standart I – Bruker Daltonics) (Protein Calibration Standart I- Bruker Daltonics).

O processamento dos espectros foi realizado utilizando o software Flex Analysis v. 3.0 (Bruker Daltonics). Os extratos de cada estirpe foram aplicadas em 3 pontos diferentes da placa de MALDI e a aquisição dos espectros foi realizada como descrito acima. Os ensaios foram repetidos em dois dias diferentes para *Aeromonas* e um único dia para *E.coli*.

### 5.2.3 Análise e Agrupamento dos espectros

Os espectros gerados foram submetidos à análise de picos em comum utilizando o software Speclust disponível no site: <http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html> (ALM *et.al.*, 2006), a fim de gerar um espectro médio para cada amostra; a variação tolerada foi de  $\pm 5$  m/z. Foi utilizado como critério para o estabelecimento de picos comuns aqueles presentes em pelo menos 2 dos 3 espectros obtidos (67%) (FRANCO *et.al.*, 2010). Após essa etapa, os espectros médios finais de todas as estirpes foram analisados pelo mesmo software, que compara a distância entre cada par da lista de picos, agrupando os espectros de acordo com a similaridade e gerando um dendrograma.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

Antes de dar início aos ensaios com *Aeromonas* e isolados de *E. coli*, a reprodutibilidade do ensaio foi avaliada conforme descrito abaixo.

#### 6.1.1 Reprodutibilidade dos Espectros

Para avaliar a reprodutibilidade técnica do espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF utilizado nos ensaios, um extrato proteico da estirpe de *E. coli* ATCC 25922 foi preparado conforme descrito no item 5.2.1 de Materiais e Métodos. Alíquotas do mesmo extrato foram distribuídas em 6 pontos diferentes da placa de MALDI. Os resultados obtidos estão mostrados na FIGURA 1 e TABELA 3.

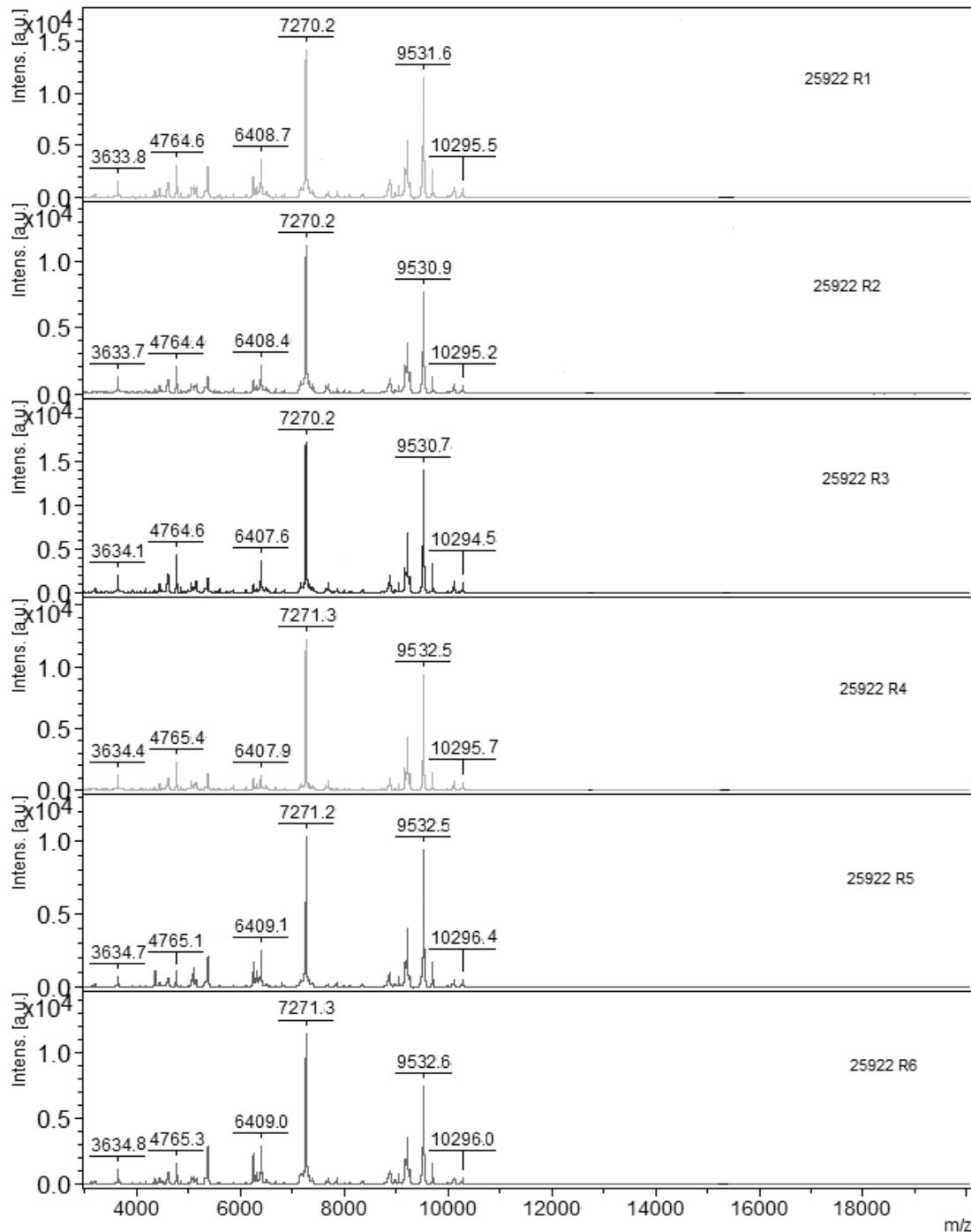


FIGURA 1 – ESPECTROS OBTIDOS PARA AS REPLICATAS TÉCNICAS DE *E. coli* ATCC 25922

A figura representa espectros de massa obtidos para replicatas de *E. coli* ATCC 25922 preparadas a partir de um mesmo extrato. Estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 3.000 e 20.000 Da, e a intensidade em unidades arbitrárias.

FONTE: O autor

Pode-se observar que embora ocorram variações na intensidade e frequência de alguns picos, os espectros obtidos são similares e apresentam baixo ruído. Os dados de m/z gerados estão indicados na TABELA 3.

TABELA 3 – FREQUÊNCIA E REPRODUTIBILIDADE DOS PICOS M/Z DE *E. coli* ATCC 25922 POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF

Média	Desvio Padrão	R1	R2	R3	R4	R5	R6
3124,7	0,3	3124,3	3124,4	3124,8	3124,7	3124,9	3124,8
3154,9	0,6	3154,3	3154,5	3154,9	3154,8	3154,9	3156,1
3176,5	0,9	3176,3	3176,8	3178,1	3176,0	3175,5	3176,3
3576,4	0,4		3576,0	3576,2	3576,9		3576,7
3634,2	0,5	3633,8	3633,7	3634,1	3634,4	3634,7	3634,8
3671,2	0,6	3671,2	3670,6	3671,9			
4181,3	0,7	4180,9	4180,8	4180,9	4181,5	4180,9	4182,5
4362,1	0,5	4361,5	4361,7	4361,8	4362,5	4362,4	4362,6
4421,8	1,3	4420,7	4420,5	4421,8	4422,2		4423,8
4434,7	0,5	4434,3	4434,2	4434,3	4435,3	4435,3	4434,6
4445,1	1,3	4443,8		4444,3	4445,9		4446,5
4493,3	0,5	4493,9	4492,3	4493,4	4493,5	4493,6	4493,3
4592,5	0,3	4592,2			4592,6		4592,8
4609,6	0,5	4609,1	4609,2	4609,1	4610,4	4609,6	4610,1
4764,9	0,4	4764,6	4764,4	4764,6	4765,4	4765,1	4765,3
5065,1	0,3	5065,1	5065,0	5064,9	5065,5	5065,4	5064,9
5093,7	0,4	5093,3	5093,4	5093,5	5094,2	5093,9	5094,1
5146,2	0,4	5145,9	5145,7	5146,1	5146,6	5146,3	5146,8
5338,2	1,3	5336,9	5337,5	5337,2	5340,4	5338,3	5338,9
5378,4	0,4	5378,0	5378,0	5378,2	5378,7	5378,6	5379,0
5405,7	0,4	5406,0	5405,5	5405,1	5405,5	5406,3	5405,9
6222,3	1,1				6221,1	6223,3	6222,6
6252,2	0,4	6251,9	6251,8	6251,9	6252,4	6252,5	6252,7
6312,6	0,4	6312,3	6312,1	6312,3	6313,0	6312,9	6313,0
6408,5	0,6	6408,7	6408,4	6407,6	6407,9	6409,1	6409,0
6504,9	0,5	6504,6	6504,6	6504,3	6505,3	6505,4	6505,2
7155,1	0,3	7154,8	7154,8	7155,1	7155,7	7155,4	7155,1
7270,7	0,6	7270,2	7270,2	7270,2	7271,3	7271,2	7271,3
7867,1	1,1	7865,9	7866,2	7866,1	7867,8	7868,0	7868,5
8365,1	0,8	8364,9	8364,4	8364,1	8366,3	8365,4	8365,6
8844,9	0,9	8844,0	8844,1	8844,3	8845,2	8846,2	8845,7
8871,0	0,9	8870,1	8870,7	8870,1	8871,9	8872,0	8871,4
8989,2	0,9		8988,4	8988,6		8990,2	8989,8
9187,3	1,0	9188,0	9186,6	9185,9	9187,1	9188,4	9187,9
9221,5	0,7	9221,0	9220,8	9220,8	9222,3	9222,3	9222,0
9531,8	0,8	9531,6	9530,9	9530,7	9532,5	9532,5	9532,6
10295,6	0,7	10295,5	10295,2	10294,5	10295,7	10296,4	10296,0

FONTE: O autor

Trinta e sete picos  $m/z$  foram detectados para *E. coli* ATCC 25922. Destes, 30 (81%) apresentaram frequência de 100% em todas as replicatas e a variação máxima das massas detectadas foi de 4 Da dentro do intervalo estabelecido de  $\pm 5$  Da (TABELA 3).

Estes resultados indicam que a reprodutibilidade técnica é aceitável. A variação biológica foi analisada em 2 dias diferentes. Foram observadas variações no número e na intensidade dos picos obtidos, e a reprodutibilidade foi similar à do ensaio de reprodutibilidade técnica.

#### 6.1.2 Análise de *Aeromonas* spp. Através de Espectrometria de Massa MALDI-TOF

Foram analisadas 99 estirpes de *Aeromonas* spp. incluindo as espécies *A. trota*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv sobria e *Aeromonas* spp. *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* BAA 644 foram utilizadas como grupo externo. Os espectros de massa representativos para cada espécie estão mostrados na FIGURA 2. Os picos  $m/z$  mais conservados entre *Aeromonas* estão indicados na TABELA 4. A comparação e o *clustering* das listas de picos  $m/z$  de todas as estirpes foram realizados com auxílio do programa SPECLUST, que gerou o dendrograma (FIGURA 3).

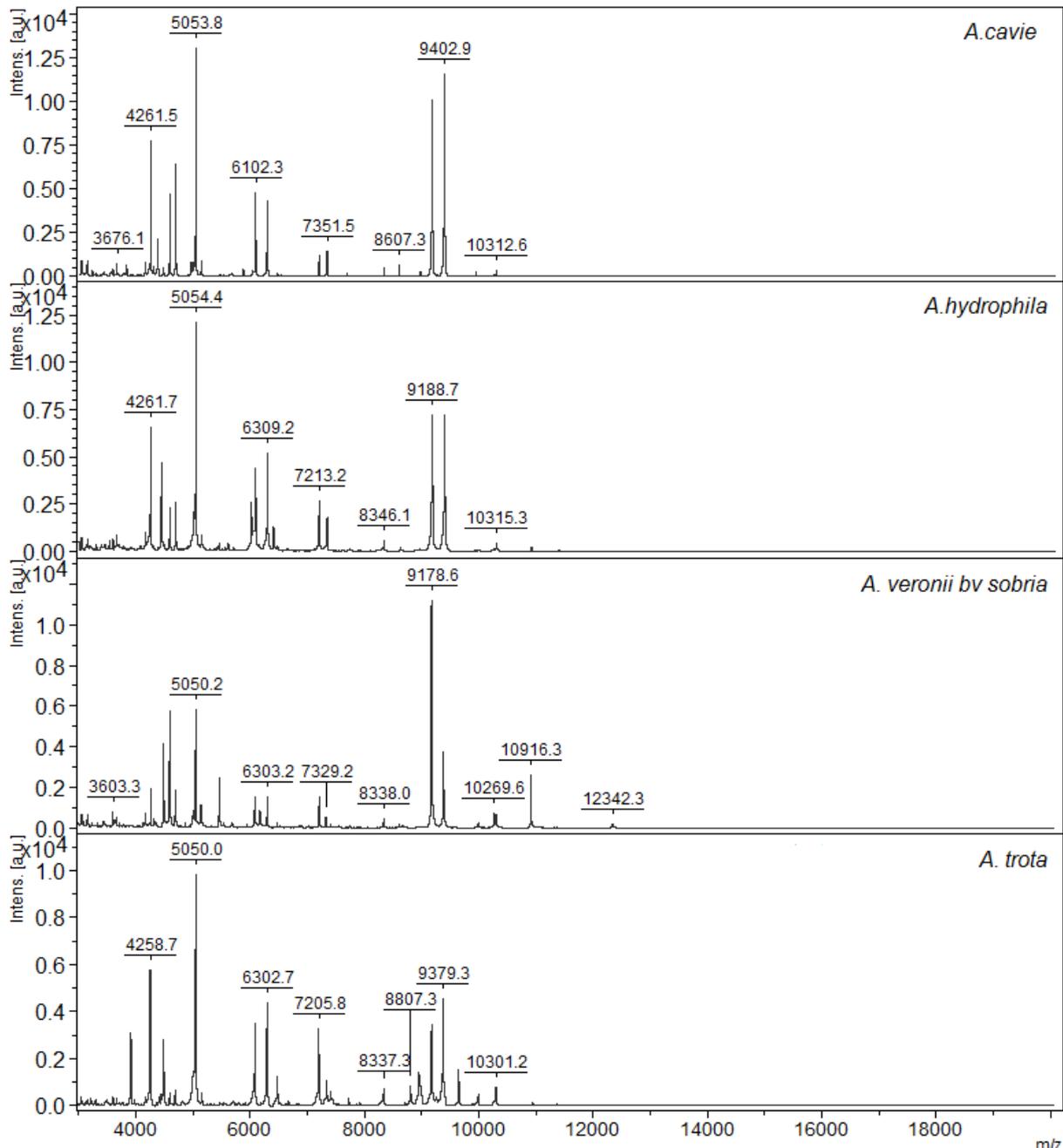


FIGURA 2 – ESPECTROS DE MASSA CARGA (M/Z) DE ESPÉCIES DE *Aeromonas* ANALISADAS.

A figura mostra espectros de massa obtidos para 4 estirpes de *Aeromonas* representando cada uma das espécies estudadas. Estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 3.000 e 20.000 Da, e a intensidade em unidades arbitrárias.

FONTE: O autor

Os picos m/z estão distribuídos na faixa de aproximadamente 3.000 a 10.000 Da. Poucos picos com massa superior a 10.300 Da foram observados. A TABELA 4 mostra os picos mais conservados entre *Aeromonas* e as respectivas frequências de acordo com a espécie. A presença desses picos em *Salmonella* e *E. coli* também é indicada.

TABELA 4 – FREQUÊNCIA DE PICOS DE MASSA CARGA (M/Z) ENTRE ESTIRPES DE *Aeromonas* spp E GRUPO EXTERNO.

Pico (m/z)	N	AVs. (n=14)	AT (n=03)	AH (n=13)	AC (n=60)	A spp. (n=07)	AC ref	AH ref	SB	EC
4259 (4256-61)	98	100%	100%	100%	100%	100%	+	+	-	-
4487 (4479-93)	59	71%	100%	21%	62%	57%	+	-	-	-
4591 (4589-94)	84	100%	34%	100%	74%	100%	+	+	-	-
4699 (4691-704)	89	50%	67%	100%	100%	85%	+	+	-	-
5051 (5049-53)	99	100%	100%	100%	100%	100%	+	+	-	-
6095 (6091-100)	99	100%	100%	100%	100%	100%	+	+	+	-
<b>6304</b> <b>(6301-08)</b>	98	100%	100%	100%	100%	100%	+	+	-	-
<b>6478</b> <b>(6476-81)</b>	40	50%	100%	14%	46%	-	+	+	-	-
<b>7207</b> <b>(7204-12)</b>	97	100%	100%	93%	100%	100%	+	+	-	-
7345 (7344-52)	59	-	100%	78%	69%	28%	+	+	-	-
8339 (8336-45)	92	71%	100%	86%	90%	85%	+	+	-	-
8619 (8616-24)	19	100%	-	14%	2%	28%	-	-	-	-
8806 (8806-08)	3	-	100%	-	-	-	-	-	-	-
8962 (8959-65)	49	-	100%	28%	69%	-	+	+	-	-
<b>9180</b> <b>(9176-87)</b>	100	100%	100%	100%	100%	100%	+	+	-	+
<b>9384</b> <b>(9379-88)</b>	17	100%	100%	-	-	-	-	-	-	-
9394 (9391-403)	82	-	-	100%	100%	100%	+	+	-	-
<b>10304</b> <b>(10300-14)</b>	86	93%	100%	71%	84%	100%	+	+	-	-
10917 (10913-28)	46	100%	34%	50%	38%	28%	+	-	-	-

O número entre parênteses indica a variação de massa-carga (m/z) entre as estirpes analisadas; +/- indica a presença ou ausência de massa carga; N, numero de bactérias que apresentam a massa carga. Em negrito estão os picos encontrados em outros estudos. AVs – *A. veronii* sobria; AT – *A. trota*; AH – *A. hydrophila*; AC – *A. caviae*; A spp – *Aeromonas* spp; AC ref – *A. caviae* ATCC 14486; AH ref – *A. hydrophila* ATCC 7966; SB, *Salmonella* Braenderup BAA 664; EC, *E. coli* ATCC 25922.

Dezenove picos que compreendem aqueles mais frequentes estão indicados na TABELA 4. Destes, apenas 2 são compartilhados com o grupo externo. São eles, m/z 6095 presente em *Salmonella* BAA 664, e 9180 presente em *E. coli* ATCC 25922. Outros menos frequentes podem ser importantes para a identificação de algum grupo particular.

Quatro picos, m/z 4259, 5051, 6304 e 9180 Da estão presentes em todas as estirpes de *Aeromonas* analisadas. Isso indica que os 3 primeiros poderiam ser utilizados como marcadores para bactérias desse gênero. O pico m/z 9180 também está presente em *E. coli*, mas é importante na identificação das *Aeromonas* uma vez que está presente em todas as *Aeromonas* spp. analisadas.

A massa carga de m/z 8806 Da foi detectada apenas em *A. trola*, e poderia ser um marcador para esta espécie. No entanto apenas 3 estirpes dessa espécie foram analisadas, portanto essa informação precisa ser confirmada utilizando um maior número dessas bactérias. Outros dados úteis para a identificação dessas estirpes mostram que *A. trola* e *A. veronii* bv sobria compartilham a massa carga m/z 9384, enquanto a massa de m/z 9394 é compartilhada por *A. caviae* e *A. hydrophila*.

A FIGURA 3 mostra o agrupamento das estirpes de *Aeromonas* e bactérias do grupo externo de acordo com as similaridades e diferenças nos perfis espectrais.

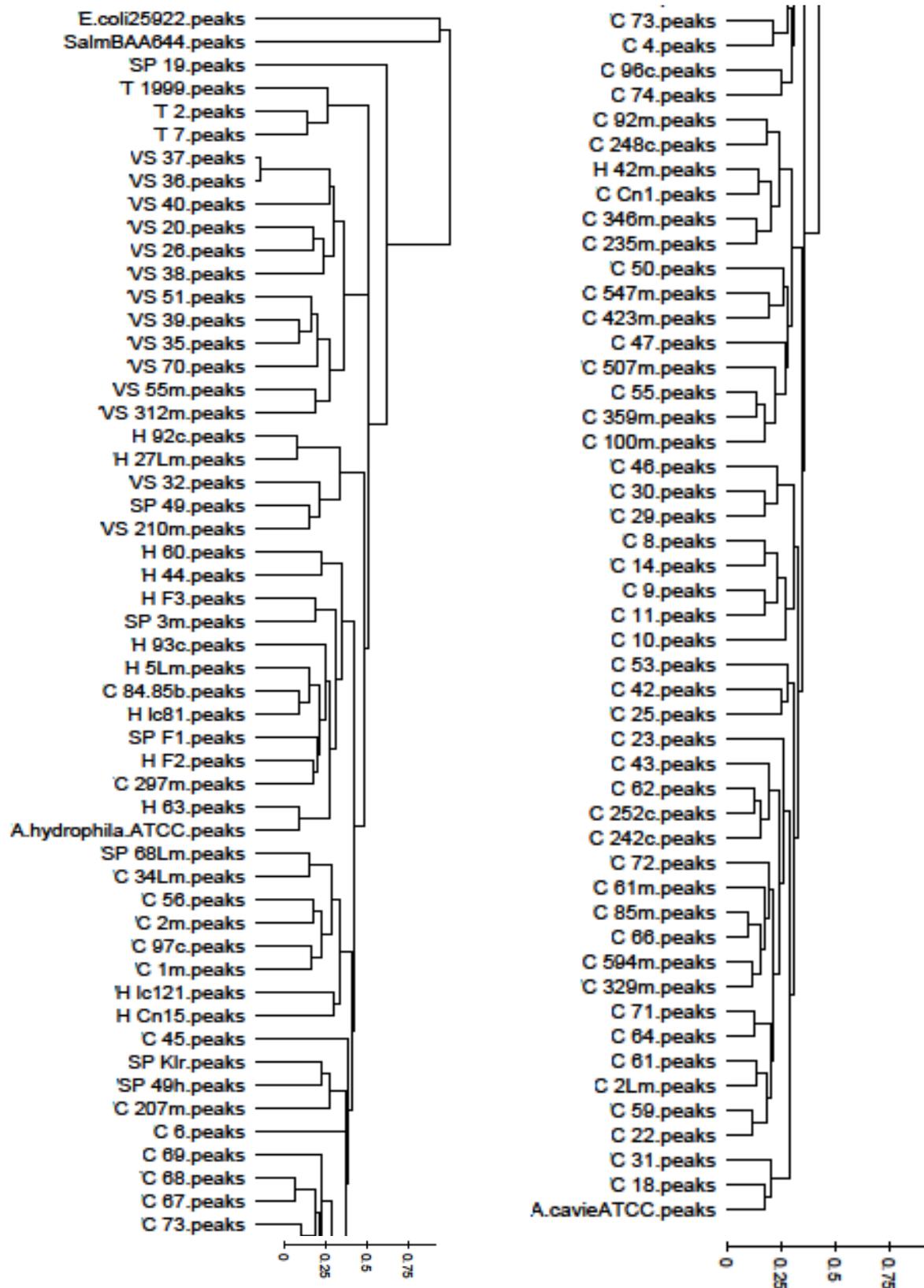


FIGURA 3 – DENDROGRAMA GERADO COM OS RESULTADOS DE MALDI-TOF DAS ESTIRPES DE *Aeromonas* E GRUPO EXTERNO.

As letras C, H, SP, VS e T representam respectivamente *A. cavie*, *A. hydrophila*, *Aeromonas* spp, *A. veronii* bv sobria e *A. trota*. A escala indica a distância relativa utilizada no *clustering*.  
 FONTE: O autor

A análise do dendrograma mostra claramente a separação do grupo externo contendo a *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella* BAA 664 das estirpes de *Aeromonas* spp. Com relação as *Aeromonas* spp analisadas a metodologia de MALDI-TOF permitiu separar as espécies de *A. trota*, agrupadas no mesmo ramo. Além disso, a maioria das estirpes de *A. veronii* bv sobria e *A. caviae* também foram nitidamente separadas. A separação de *A. hydrophila* não é tão clara, uma vez que algumas estirpes de *Aeromonas* spp e *A. caviae* foram agrupadas próximas.

Os resultados obtidos sugerem que a metodologia é útil para a identificação de *Aeromonas* spp.

### 6.1.3 *E. coli*

No total foram analisados 135 isolados *E. coli* incluindo estirpes comensais(24) e patótipos.(111) Adicionalmente, 8 estirpes foram utilizadas como referência: *E. coli* ATCC 25922, ATCC 35218, DH10B, IAL 307 (O124:K72, EIEC), IAL 2391 (EAEC), C1845 (DAEC), E2348/69 (EPEC) and EDL 933 (STEC). *Aeromonas caviae* ATCC 14486 e *Salmonella enterica* BAA 664 foram utilizadas como grupo externo.

Os resultados estão representados ns FIGURAS 4 e TABELA 5.

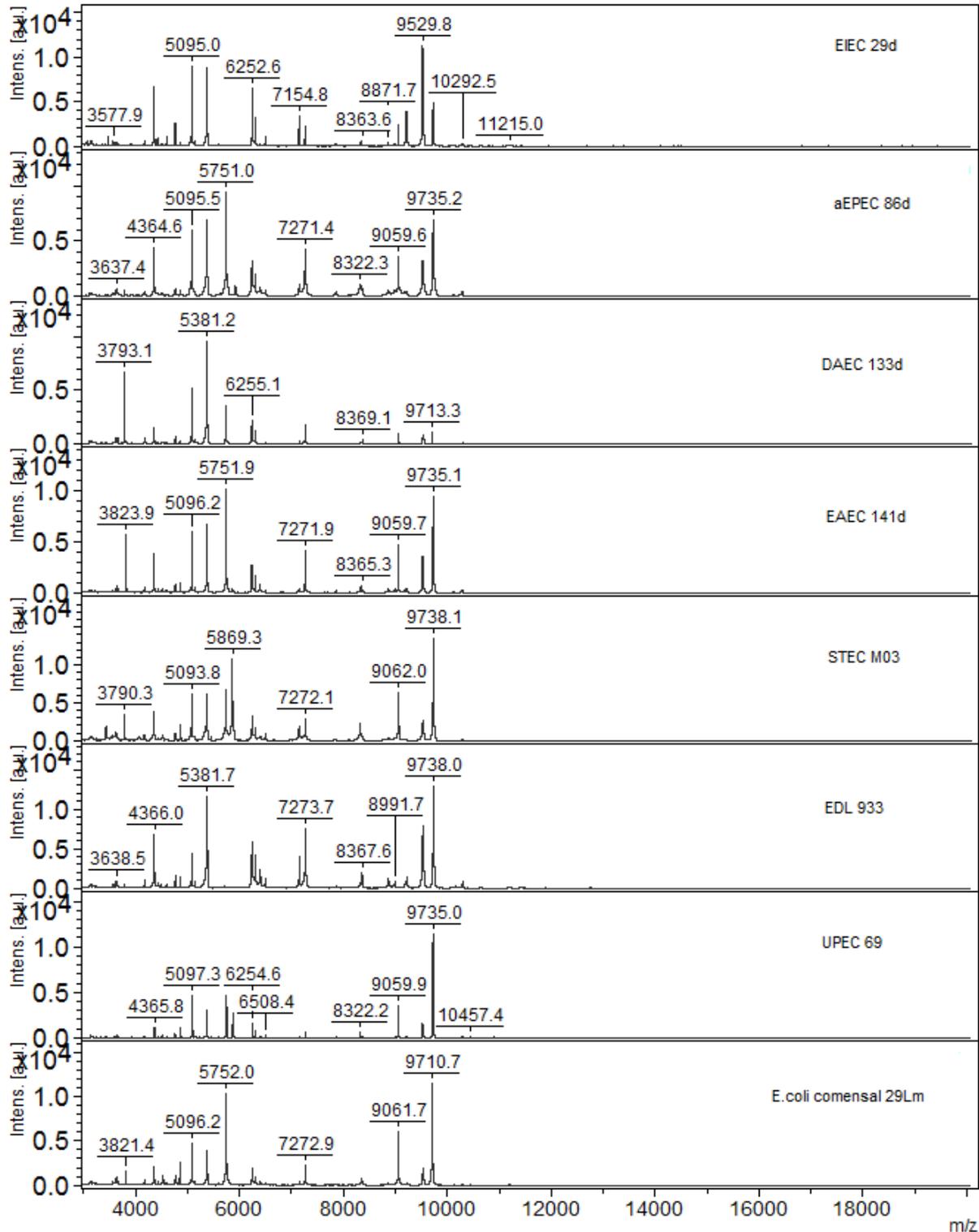


FIGURA 4 – ESPECTROS DE MASSA CARGA ( $m/z$ ) DAS CATEGORIAS DE *E. coli* ANALISADAS.

A figura mostra espectros de massa obtidos para 8 estirpes de *E. coli*, incluindo os patotipos de *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC), *E. coli* que adere difusamente (DAED), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (M03 e EDL 933), *E. coli* uropatogênica, e de *E. coli* comensal. Estão indicadas a relação massa-carga ( $m/z$ ), na faixa entre 3.000 e 20.000 Da, e a intensidade em unidades arbitrárias.

Fonte: O autor

Os picos  $m/z$  estão distribuídos na faixa de aproximadamente 3000 a 10.000 Da, e poucos picos com massa superior a essa foram observados. Os espectros são similares, no entanto podem ser observadas diferenças entre eles quanto ao número de picos observados.

A TABELA 5 mostra os picos mais conservados entre *E. coli* e as respectivas frequências de acordo com a espécie. Picos menos conservados, mas com frequência superior a 50% em pelo menos uma das categorias de *E. coli* também estão indicados. A presença desses picos em *Salmonella* e *Aeromonas* também está indicada.

TABELA 5 – FREQUÊNCIA DE MASSAS-CARGAS (M/Z) ENTRE ESTIRPES DE *E. coli* E GRUPO EXTERNO

Pico (m/z)	N	COM (n=24)	aEPEC (n=29)	DAEC (n=3) <sup>#</sup>	EAEC (n=14)	EIEC (n=2) <sup>#</sup>	STEC (n=22)	UPEC (n=45)	EPEC (n=1)	ATCC 25922	ATCC 35218	DH10B	Salm	Aer
<b>3128</b>	42	-	7%	-	7%	-	9%	73%	+	+	+	+	-	-
<b>(3125-31)</b>														
<b>3158</b>	38	-	10%	-	21%	-	4%	60%	+	+	+	+	-	-
<b>(3156-60)</b>														
<b>3637</b>	74	17%	38%	33%	64%	-	36%	82%	+	+	+	+	-	-
<b>(3635-40)</b>														
<b>3792</b>	49	62%	14%	67%	14%	50%	41%	29%	+	+	+	-	-	-
<b>(3788-96)</b>														
<b>3820</b>	38	62%	3%	33%	43%	50%	9%	22%	+	+	-	-	-	-
<b>(3814-25)</b>														
<b>3849</b>	19	58%	10%	-	14%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>(3843-54)</b>														
<b>4184</b>	47	85%	17%	33%	14%	50%	9%	69%	+	+	-	+	-	-
<b>(4182-89)</b>														
<b>4364</b>	137	100%	86%	100%	78%	100%	100%	100%	+	+	+	+	+	-
<b>(4360-67)</b>														
<b>4532</b>	58	17%	41%	33%	57%	-	18%	62%	+	-	-	-	-	-
<b>(4529-35)</b>														
<b>4613</b>	32	-	10%	-	-	50%	4%	51%	-	+	+	+	+	-
<b>(4610-18)</b>														

Continua

Continuação

Pico (m/z)	N	COM (n=24)	aEPEC (n=29)	DAEC (n=3) <sup>#</sup>	EAEC (n=14)	EIEC (n=2) <sup>#</sup>	STEC (n=22)	UPEC (n=45)	EPEC (n=1)	ATCC 25922	ATCC 35218	DH10B	Salm	Aer
<b>4768</b>	61	17%	59%	33%	64%	50%	27%	47%	-	+	-	+	-	-
<b>(4765-71)</b>														
4776	56	25%	17%	33%	43%	-	18%	69%	+	+	+	-	-	-
<b>(4773-80)</b>														
<b>4869</b>	78	12%	72%	-	78%	50%	68%	58%	-	-	-	+	-	-
<b>(4866-72)</b>														
5069	47	4%	17%	-	28%	-	4%	71%	+	+	-	+	-	+
<b>(5065-74)</b>														
<b>5095</b>	141	100%	93%	100%	100%	100%	100%	100%	+	+	+	+	-	-
<b>(5093-99)</b>														
<b>5149</b>	63	17%	28%	33%	43%	50%	9%	80%	+	+	+	+	-	+
<b>(5146-53)</b>														
<b>5342</b>	81	87%	28%	33%	43%	100%	50%	62%	+	+	+	+	-	-
<b>(5338-51)</b>														
<b>5380</b>	144	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	+	+	+	+	+	-
<b>(5377-84)</b>														
<b>5752</b>	86	100%	38%	67%	57%	50%	45%	60%	+	-	+	+	-	-
<b>(5748-55)</b>														
<b>6253</b>	141	100%	93%	100%	93%	100%	100%	100%	+	+	+	+	+	-
<b>(6250-58)</b>														

Continua

Continuação

Pico (m/z)	N	COM (n=24)	aEPEC (n=29)	DAEC (n=3) <sup>#</sup>	EAEC (n=14)	EIEC (n=2) <sup>#</sup>	STEC (n=22)	UPEC (n=45)	EPEC (n=1)	ATCC 25922	ATCC 35218	DH10B	Salm	Aer
<b>6314</b> <b>(6310-18)</b>	132	100%	72%	67%	86%	100%	100%	100%	+	+	+	+	-	-
<b>6409</b> <b>(6405-14)</b>	106	58%	83%	67%	71%	50%	73%	80%	-	+	+	+	-	-
<b>7156</b> <b>(7153-61)</b>	80	29%	31%	33%	36%	100%	86%	78%	-	+	-	+	-	-
<b>7271</b> <b>(7266-77)</b>	143	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	+	+	+	+	-	-
<b>8365</b> <b>(8360-73)</b>	88	29%	34%	33%	43%	100%	64%	95%	+	+	+	+	+	-
<b>8871</b> <b>(8866-80)</b>	66	4%	41%	33%	36%	50%	64%	64%	-	+	+	+	-	-
<b>8892</b> <b>(8887-8902)</b>	59	-	41%	33%	28%	-	59%	60%	-	+	-	+	-	-
<b>8989</b> <b>(8984-98)</b>	75	8%	45%	-	43%	50%	54%	82%	-	+	+	+	-	+
<b>9060</b> <b>(9052-68)</b>	142	100%	100%	100%	100%	100%	95% <sup>§</sup>	100%	+	+	+	+	-	-
<b>9184</b> <b>(9180-90)</b>	77	-	79%	33%	50%	50%	64%	64%	-	+	-	-	-	-

Continua

Conclusão	N	COM (n=24)	aEPEC (n=29)	DAEC (n=3) <sup>#</sup>	EAEC (n=14)	EIEC (n=2) <sup>#</sup>	STEC (n=22)	UPEC (n=45)	EPEC (n=1)	ATCC 25922	ATCC 35218	DH10B Salm	Aer
<b>9220</b>	97	4%	86%	67%	86%	50%	68%	84%	-	+	+	-	-
<b>(9214-31)</b>													
<b>9532</b>	139	83%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	+	+	+	-	-
<b>(9525-40)</b>													
<b>9550</b>	110	37%	72%	-	79%	50%	86%	100%	+	+	+	-	-
<b>(9544-55)</b>													
<b>9735</b>	103	75%	79%	-	86%	50%	91%	62%	-	-	+	-	-
<b>(9729-45)</b>													
<b>10131</b>	39	-	21%	-	21%	-	18%	55%	-	+	-	-	-
<b>(10127-38)</b>													
<b>10294</b>	75	8%	34%	33%	43%	50%	54%	87%	-	+	+	-	+
<b>(10288-304)</b>													

Frequência expressa em %. Em negrito estão os picos encontrados em outros estudos. O número entre parênteses indica a variação de massa-carga (m/z) entre as estirpes analisadas; +/- indica a presença ou ausência de massa carga; N, número de bactérias que apresentam a massa carga; COM, *E. coli* comensais; aEPEC, *E. coli* enteropatogênica atípica; DAEC, *E. coli* que adere difusamente; EAEC, *E. coli* enteroagregativa; EIEC, *E. coli* enteroinvasora; STEC, *E. coli* produtora de toxina Shiga; UPEC, *E. coli* uropatogênica; EPEC, *E. coli* enteropatogênica típica; Salm, *Salmonella* BAA 644; Aer, *Aeromonas caviae* ATCC 14486.<sup>s</sup> Exceto EDL 933 (O157:H7); <sup>#</sup> O baixo número de amostras não permite uma análise confiável.

Entre os 36 picos m/z citados na TABELA 5, 5 são compartilhados entre *E. coli* e *Salmonella* (m/z 4364, 4613, 5380, 6253 e 8365) e 4 entre *E. coli* e *Aeromonas* (m/z 5069, 5149, 8989 e 10294).

Apenas dois picos de massas foram compartilhados entre todas as estirpes de *E. coli*, m/z 5380 e 7271 Da. O primeiro deles também está presente em *Salmonella* o que sugere que possa ser um marcador para bactérias da família *Enterobacteriaceae*. O pico m/z 9060 Da foi compartilhado entre todas as *E. coli*, exceto pela estirpe de STEC EDL 933. Em relação aos outros picos observam-se diferenças quanto a sua distribuição entre as estirpes.

A FIGURA 5 mostra o agrupamento das estirpes de *E. coli* e bactérias do grupo externo de acordo com as similaridades e diferenças nos perfis espectrais.

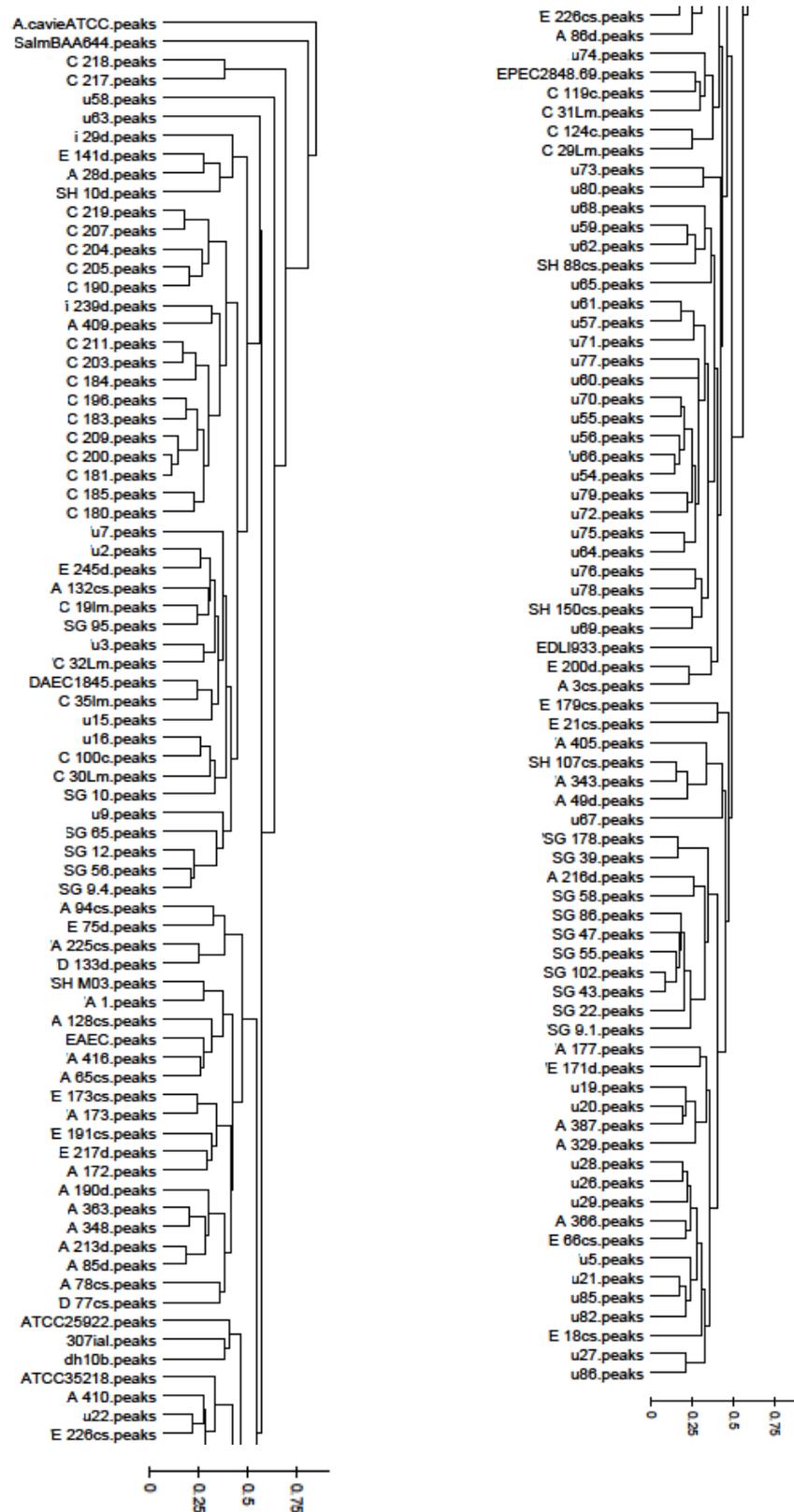


FIGURA 5 – DENDROGRAMA GERADO COM OS RESULTADOS DE MALDI-TOF DAS ESTIRPES DE *E.coli*

As letras A, C, D, E, i, SG, SH e U indicam respectivamente aEPEC, *E. coli* comensal, DAEC, EAEC, EIEC, STEC bovina, STEC humana e UPEC. A escala indica a distância relativa usada para o *clustering*.

Fonte: O autor

A FIGURA 5 mostra que *Aeromonas* se encontra mais distante das estirpes de *E. coli* do que *Salmonella*. Isto era esperado uma vez que *E. coli* e *Salmonella* fazem parte da família *Enterobacteriaceae*.

Além disso, 15 (62%) das estirpes comensais estão agrupadas num mesmo ramo, e sete outras próximas. Isso sugere que a metodologia de MALDI-TOF é capaz de distinguir esse grupo de bactérias. Indica também que há diferenças entre elas. Outro agrupamento importante é observado entre as UPEC, com 23 (51%) delas presentes num mesmo ramo e outras 12 (27%) num grupamento próximo. Grupamentos com menor número de estirpes de outras categorias também estão presentes.

## 7 DISCUSSÃO

A identificação de isolados bacterianos é rotineiramente realizada nos laboratórios clínicos. O método mais frequentemente empregado ainda é a biotipagem, baseada na determinação das atividades bioquímicas das bactérias, o que requer a realização de sub-cultivos e incubação por aproximadamente 18 horas (SILVA, 2006). Sistemas de identificação baseados na análise de DNA, particularmente PCR são sensíveis e mais rápidos, estão comercialmente disponíveis apenas para uns poucos microorganismos. Além disso, requerem intensa mão de obra, e vários reagentes de custo elevado (MURRAY, 2010).

Recentemente uma série de trabalhos tem mostrado que a metodologia de espectrometria de massa pode ser utilizada para a identificação de bactérias ao nível de gênero, espécie e até mesmo subespécie (MANDRELL *et.al.*, 2005; DONOHUE *et.al.*, 2006; BÖHME *et al* 2010; MURRAY, 2010; SAUER e KLIEM, 2010; SEIBOLD *et.al.*, 2010; CARBONNELLE *et.al.*,2011; DEKKER e BRANDA 2011). Protocolos para o preparo e análise bacteriana por espectrometria de massa MALDI-TOF foram propostos (LIU *et.al.*, 2007; SAUER *et.al.*, 2008).

Tanto a análise de células bacterianas inteiras bem como extratos de proteínas solubilizadas preparados a partir de culturas tem sido empregadas na identificação por MALDI-TOF MS (DONOHUE *et.al.*, 2006; LIU *et.al.*, 2007; BÖHME, *et. al*, 2010).

No entanto os resultados das análises são suscetíveis a alterações nas condições experimentais. A reprodutibilidade e acurácia do MALDI-TOF podem ser afetadas pelo meio de cultura, tempo de crescimento, concentração de bactérias, preparo da amostra e matriz utilizada (LAY, 2001; LAY e HOLLAND, 2000; VALENTINE *et.al.*, 2005; MAZZEO *et.al.*, 2006).

Para a realização do presente trabalho foi selecionado o meio de cultura ágar MacConkey, amplamente utilizado nos laboratórios clínicos para o isolamento de enterobactérias e outros gram-negativos não exigentes. As demais condições também citadas acima também foram padronizadas conforme descrito no item 5.2.1 (Material e Método). Em relação ao preparo da amostra foi utilizado o lisado celular, uma vez que segundo BÖHME e colaboradores (2010), a análise de células totais foi desvantajosa em relação a análise do extrato proteico, que apresentou menor ruído e maior reprodutibilidade.

A reprodutibilidade dos picos  $m/z$  dos espectros é fundamental para que a espectrometria de massa MALDI-TOF possa ser utilizada na identificação de bactérias (DONOHUE *et.al.*, 2006; MAZZEO *et al.*, 2006). Embora tenham ocorrido variações na intensidade e frequência de alguns picos entre as replicatas, a (FIGURA 1) mostra a presença de picos consistentes nos ensaios realizados com a estirpe *E. coli* ATCC 25922, indicando que os espectros gerados são reprodutíveis. Além disso, 84% dos picos  $m/z$  foram 100% reprodutíveis (TABELA 3), indicando que a reprodutibilidade técnica é adequada.

### 7.1 *Aeromonas*

Para as estirpes de *Aeromonas* spp estudadas, obtiveram-se diferentes perfis, cujas massas-cargas variaram de 3000 a 11000 Da. Os picos mais frequentes estão apresentados na TABELA 4.

Os picos  $m/z$  4591, 6304 e 9384 Da (TABELA 4) também foram detectados nas estirpes analisadas por BOHME *et.al.*, (2010) e DONOHUE *et.al.*, (2006), que realizaram seu estudo em condições experimentais diferentes das utilizadas no presente trabalho. O pico  $m/z$  4591 Da foi encontrado em 83% das estirpes analisadas, e estava presente em 100% de *A. veronii* bv.sobria e *A. hydrophila*, e em frequências de 34 e 78% nas duas outras espécies (TABELA 4).

A massa  $m/z$  6304 Da foi detectada em 100% das *Aeromonas* analisadas, o que sugere que seja um marcador para estas bactérias deste gênero. Em relação a  $m/z$  9384, foi encontrado na maioria das estirpes analisadas por DONOHUE *et.al.*, (2006). Nas condições utilizadas no presente trabalho este pico foi detectado em todas as estirpes de *A. veronii* bv. sobria e *A. hydrophila* e nas 2 estirpes de referência. Portanto está ausente das demais estirpes. Entretanto, como pode ser observado na TABELA 04, o pico  $m/z$  9394 Da está presente em todas as outras espécies (*A. hydrophila*, *A. caviae* e em *Aeromonas* spp). Isto pode sugerir que ambos os picos representem uma mesma massa, para a qual houve maior variação nas condições de análise. DONOHUE *et.al.*, utilizaram  $\pm 20$  Da de variação para íons acima de 9000 Da, como é o caso. Outra possibilidade é a diferença de massa observada entre os dois picos seja decorrente de substituição de aminoácidos na proteína (FAGERQUIST *et.al.*, 2010). Novos ensaios devem ser realizados para

esclarecer esse resultado, que é importante para a caracterização das *Aeromonas* ao nível de gênero ou espécie.

Além do pico m/z 6304 Da, as massas m/z 4259, 5051 e 9180 Da foram detectadas em todas as estirpes analisadas, e podem representar marcadores do gênero *Aeromonas*. A m/z 8806 Da foi detectada apenas em *A. trota* o que poderia indicar um marcador espécie-específico. Entretanto como apenas 3 estirpes foram analisadas, são necessários mais estudos com maior número de bactérias dessa espécie

Embora não tenham sido detectados marcadores espécie-específicos em *Aeromonas* a FIGURA 2, mostra que o MALDI-TOF é capaz de diferenciar as espécies de *Aeromonas* o que também foi relatado por DONOHUE *et.al.*, (2006). No entanto a metodologia empregada deve ser aperfeiçoada de modo a aumentar a discriminação entre as estirpes.

## 7.2 *E. coli*

Como também foi observado em *Aeromonas*, embora os espectros de massa sejam similares entre as *E. coli* nenhuma estirpe apresentou o mesmo *fingerprint*. Em *E. coli* as massas variaram de aproximadamente m/z 3.000 a 15.000 Da, mas a maioria apresentou picos de até 10.500 Da.

Apenas dois picos foram encontrados em todas as estirpes de *E. coli*, m/z 5380 e 7271 Da (TABELA 5).

Os picos em negrito na TABELA 05 indicam aqueles já relatados na literatura (LYNN *et.al.*, 1999; MAZZEO *et.al.*, 2006; LIU *et.al.*, 2007), confirmando que estão presentes em diferentes condições de análise e que podem ser usados como marcadores para a identificação de *E. coli*.

Vários potenciais marcadores de massa para bactérias da família *Enterobacteriaceae* foram descritos (LYNN *et.al.*, 1999), sete dos quais foram encontrados no presente trabalho. Os picos em m/z 4364, 5380 e 6253 Da foram encontrados na maioria das estirpes de *E. coli* (95-100%), bem como nas estirpes de *Salmonella*, mas estavam ausentes em *Aeromonas*. Picos em m/z 6314, 7156, 7271 e 9532 Da foram encontrados somente em *E. coli* (56-100%) (TABELA 5). Além disso, o sinal em m/z 8897 previamente descrito no gênero de *Escherichia* (MAZZEO

*et.al.*, 2007) provavelmente corresponde ao m/z 8892 Da detectado em ~40% das estirpes analisadas no presente trabalho. Os dados indicam que essas massas são frequentemente encontradas em *E. coli* e podem representar marcadores para família ou gênero. A falha ao detectar todos os marcadores em todas as *E. coli* testadas pode ser em parte devida as diferentes condições experimentais.

Como esperado, apenas alguns picos (m/z 5069, 5149, 8989 e 19294 Da) foram comuns entre *Aeromonas* e *E. coli*, e entre *Salmonella* e *E. coli* (m/z 4364, 4613, 5380, 6253 e 8365 Da).

A capacidade do MALDI-TOF distinguir entre estirpes de *E. coli* isoladas de diferentes fontes (animais, humanos) foi relatada por Siegrist e colaboradores (2007). Por sua vez, Muroi *et.al.*, (2011) sugerem que MALDI-TOF é capaz de discriminar estirpes de *E. coli*. Mas que no entanto é necessário aperfeiçoar a metodologia de modo a aumentar a reprodutibilidade dos espectros (MUROI *et al* 2011).

No presente trabalho não foram encontrados picos grupo-específicos entre as estirpes de *E. coli*. Juntamente com picos totalmente conservados foram detectados outros com frequências variáveis (0-95%) entre os grupos de *E. coli* (TABELA 5). Observou-se que uma combinação dos picos totalmente conservados (considerando a presença ou ausência) e dos picos variáveis pode ajudar a distinguir pelo menos duas das categorias de *E. coli*. Por exemplo, todas as estirpes comensais apresentam os picos em m/z 4364, 5095, 5380, 5752, 6253, 6314, 7271 e 9060 Da. E nenhuma delas apresentou picos em m/z 3128, 3158, 4613, 8892, 9184 e 10131 Da. Além disso, a presença dos picos m/z 5342, 3820 e 3849 Da pode ajudar a identificar estas estirpes. Essas características sugerem que estirpes comensais de *E. coli* podem ser distinguidas através de MALDI-TOF MS. Este estudo também sugere que a ausência do pico em m/z 5752Da é uma forte indicação de que a estirpe não é do grupo comensal.

O grupo UPEC contém 9 picos totalmente conservados entre as estirpes e, além disso, outros 10 apresentaram frequências entre 71 a 95% (TABELA 2). Entre estes, a presença dos dois picos, m/z 3128 e 8365 Da, pode ser um bom indicador de UPEC. E também, nenhuma bactéria desse grupo apresentou o pico em m/z 3849 Da nas condições utilizadas.

Por outro lado, o pico em m/z 9060 Da esteve presente em todas *E. coli* analisadas, exceto na STEC estirpe EDL 933 (TABELA 5). Uma vez que todas as

STEC analisadas pertencem a outros sorotipos, que não o O157:H7 (FARAH *et.al.*, 2007; PIGATTO *et al*, 2008, De TONI, FIALHO,2009), os dados confirmam que entre este patotipo, apenas o sorotipo O157:H7 não apresenta o pico m/z 9060 Da, como já relatado em outros estudos (MAZZEO *et.al.* 2007; 2010, FAHERQUIST *et.al.*, 2010).

Os outros grupos de *E. coli* parecem ser mais homogêneos, mas é possível que o desenvolvimento de um algoritmo com os dados deste trabalho possa, eventualmente, permitir a distinção entre eles.

Uma vez que apenas 1 a 3 cepas de EPEC, EIEC e DAEC típicas foram analisadas, são necessários mais estudos para identificar marcadores para estes patótipos.

A FIGURA 5 mostra que a separação de ao menos alguns grupos de *E. coli* através de MALDI-TOF é possível. Modificações na metodologia que promovam maior reprodutibilidade devem possibilitar essa distinção.

Os dados obtidos com o MALDI-TOF demonstraram que há uma grande diversidade entre os perfis de massa de *E. coli* e *Aeromonas* spp estudadas, o que foi possível verificar devido ao maior número de estirpes analisadas em relação ao número de estirpes disponíveis na literatura. Portanto esta técnica tem potencial para distinguir com precisão grupos de *E. coli* e espécies de *Aeromonas* spp. A padronização das condições de crescimento, preparo da amostra e calibração do equipamento, são de suma importância para garantir a reprodutibilidade e acurácia da identificação.

## 8 CONCLUSÃO

Os picos  $m/z$  4259, 5051, 6304 foram detectados em todas as estirpes de *Aeromonas* analisadas, o que indica que podem ser marcadores para bactérias deste gênero.

O pico  $m/z$  9180 foi detectado em todas as *Aeromonas* analisadas e também em *E. coli*, mas é importante para a identificação das *Aeromonas*

O dendrograma gerado com os dados dos espectros das estirpes mostra que o MALDI-TOF é capaz de diferenciar as espécies de *Aeromonas*.

Dois picos,  $m/z$  5380 e 7271, foram encontrados em todas as estirpes de *E. coli* analisadas.

Os picos 4364, 5095, 6253, 6314, 9060 e 9532 estão presentes entre 92 a 99% das *E. coli*.

É possível diferenciar o grupo das *E. coli* comensais e das UPEC das demais categorias dessa bactéria.

A otimização das condições de análise do MALDI-TOF permitirá distinguir maior número dos grupos de *E. coli*.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.6, p.2348-2357, 2003.
- ALM, R.; JOHANSSON, P.; HJERNØ, K.; EMANUELSSON, C.; RINGNÉR, M.; HÄKKINEN J.; Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. **Journal Proteome Research**. v.5, p.785-792, 2006.
- AL-BENWAN, K., ABBOTT,S.; JANDA, J.M.; HUYS, G.; ALBERT, M.J. Cystitis Caused by *Aeromonas caviae* **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 7, p.2348-2350, 2007.
- ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* And *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 42, n. 12, p 5849-5853, 2004.
- ARAVENA-ROMÁN, M.; HARNETT, G. B.; RILEY, T. V.; INGLIS, T. J. J.; CHANG, B. *Aeromonas aquariorum* Is Widely Distributed in Clinical and Environmental Specimens and Can Be Misidentified as *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Clinical Microbiology**. V49, n. 8, p. 3006-3008, 2011.
- BERENICE R; PIGATTO, CAROLINE PETERS; FADEL-PICHETH, C. M. T. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, doi:10.1111/j.1472-765X.2007.0, v. 44, p. 607-612, 2007
- BERNET-CAMARD, M.F., COCONNIER, M.H., HUDAULT, S., SERVIN, A.L. *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay acceleration factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**. v. 64, p. 1918-28, 1996.
- BIZZINI, A., DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, p.1549-54, 2010.
- BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16., p. 1614-1619, 2010.
- BOERLIN, P.; MCEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J.B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L. Associations between virulence factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**., v. 37, n.3, p.497-503, 1999.
- BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, I.C.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; GALLARDO, J.M.; CALO-MATA, P.; CAÑAS, B. Species Differentiation of Seafood Spoilage and

Pathogenic Gram-Negative by MALDI-TOF Mass Fingerprinting. **Journal of Proteome Research**. V.9, p. 31-69-3183, 2010.

BOPP, C.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. Manual of Clinical Microbiology. 7. ed. Washington, **ASM Press**, p.459-474, 1999.

BORRELL, N.; ACINAS, S.G.; FIGUERAS, M.G.; MARTINEZ-MURCIA, A.J. Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n. 7, p.1671-1674, 1997.

BRENNER, D. J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.2, parte B, p.556-578, Nova Iorque, EUA: Springer, 2005.

BUERIS, B. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V.102, p. 839-844, 2007.

CANTÚ, M.D; CARRILHO, E. WULFF, N.A e PALMA, M.S. Sequenciamento De Peptídeos Usando Espectrometria de Massas: Um Guia Prático. **Química. Nova**, Vol. 31, No. 3, 669-675, 2008.

CARBONELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J.-L.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical. Biochemistry**. v.44, p. 104-109, 2011.

CASTILHO, M.C.B; CASTRO, T.L.A.; ARAÚJO, V.S.; TRAJANO, R.S.; SANTOS, P.A.; PIMENTA, P.M.C.; LUCHEZE, K.; MELO, J.T.B.; GONÇALVES, A.M; NOGUEIRA, R.T.; LUNA, M.G.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. Isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, p. 53-61, 2009.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S.; TANGOMO, M.; GIRARD, M.; FRANCOIS, P. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. **Journal of Clinical Microbiology**. v.48, p.1169-75, 2010.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes and infection**. v.1, n.13, p.1129-1137, 1999.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews**. v. 8, p.26-38, 2010.

CZECZULIN, J.R., BALEPUR, S., HICKS, S., PHILLIPS, A., HALL, R., KOTHARY, M., NAVARRO-GARCIA, F., NATARO, J.P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence In enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity.**, v. 65, p. 4135-45, 1997.

DARE, D. Rapid bacterial characterization and identification by MALDI-TOF mass spectrometry. In: Tang, Y.W.; Straton, C.W. **Advanced techniques in diagnostic microbiology.** p. 117-133. Springer, 2006.

DEKKER, P. J.; BRANDA, J.A. MALDI-TOF Mass spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. **Clinical Microbiology Newsletter.** v.33, p.87-93, 2011.

DEMIREV, P.A.; FENSELAU, C. Mass spectrometry in biodefense. **Journal of Mass Spectrometry.** v.43, p.1441–1457, 2008.

DONNENBERG, M.S., WHITTAM, T.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Investigation.** v 107, p. 539, 2001

DONOHUE, M.J.; SMALLWOOD, A.W.; PFALLER, S.; RODGERS, M.; SHOEMAKER, J.A. The development of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. **Journal of Microbiology Methods.** v.65, p.380-389, 2006.

ELIAS, W.O; BARROS,S.F.; MOREIRA,C.G.; TRABULSI, L.R.; Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains among Classical Enteropathogenic *Escherichia coli* O Serogroups **Journal of Clinical Microbiology.** v.40, n.9, p. 3540-3541, 2002.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; VIEIRA, R.H.S.F.; CARVALHO, F.C.T.; TORRES, R.C.O.; SANTÁNNA, E.S.; RODRIGUES, D.P.; REIS, C.M.F. *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea Rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v.48, n.3, p. 129-133, 2006.

FAGERQUIST, C.K.; GARBUS,B.R.; MILLER,W.G.; WILLIAMS, K.E.; YEE,E.; BATES, H., BOYLE, S.; HARDEN,L.A.; COOLEY,M.B.; MANDRELL, R.E. Rapid Identification of Protein Biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight-Time-of-Flight Mass Spectrometry and Top-Down Proteomics. **Analytical Chemistry.** v.82,p. 2717–2725, 2010.

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

FARAH, Sônia M S S; SOUZA, Emanuel Maltempi de; PEDROSA, Fabio de Oliveira; IRINO, Kinue; SILVA, Lineu R da; RIGO, Liu Un; STEFFENS, Maria FAGERQUIST, C.K.; GARBUS,B.R.; MILLER,W.G.; WILLIAMS, K.E.; YEE,E.; BATES, H., BOYLE, S.; HARDEN,L.A.; COOLEY,M.B.; MANDRELL, R.E. Rapid Identification of Protein Biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by Matrix-Assisted Laser Desorption

Ionization-Time-of-Flight-Time-of-Flight Mass Spectrometry and Top-Down Proteomics. **Analytical Chemistry**. v.82,p. 2717–2725, 2010.

FIALHO, O.B. Identificação de estirpes de *Escherichia coli* Diarreio gênicas por PCR-Multiplex. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

FIGUERAS, M. J. *et.al.* Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.50, p.2069-2073, 2000.

FIGUERAS, M. J.; ALPERI, A.; SAAVEDRA, M. J.; KO, W. C.; GONZALO, N.; NAVARRO, M.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Clinical Relevance of the Recently Described Species *Aeromonas aquariorum*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.47, p. 3742–3746, 2009.

FOX, A. Mass Spectrometry for Species or Strains Identification after Culture or without Culture: Past, Present, and Future. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44., p. 2677-2680, 2006.

FRANCO, C. F.; MELLADO, M. C. M.; ALVES, P. M.; COELHO, A. V. Monitoring virus-like particle and viral protein production by intact cell MALDI-TOF mass spectrometry. **Talanta**, v.80, p. 1561-1568, 2010.

FRANZOLIN, M.R., ALVES, R.C., KELLER, R., GOMES, T.A., BEUTIN, L., BARRETO, M. L., MILROY, C., STRINA, A., RIBEIRO, H., TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz.**,v. 100, p. 359, 2005.

GALINDO, C. L. *et.al.* Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Currente Immunology Reviews**. v. 2, p.13-26, 2006.

GASTÓN, J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. **Digestion**. v.73 p. 102-108, 2006.

GÓMEZ-GARCÉS, J.L; SAÉZ, D; ALMAGRO, M.; FERNÁNDES-ROMERO, S.; MERINO,F.; CAMPOS, J.; OTEO, J. Osteomyelitis associated to CTX-M-15-producing *Aeromonas hydrophila*: First description in the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.70,p. 420-422, 2011.

GRIFFIN, P.M.; BOYCE, T.G. *Escherichia coli* O157:H7. In: SHELD, W.M.; ARMSTRONG, D.; HUGHES, J.M. **Emerging. Infectious. Diseases**. v.1. Washington, ASM Press, p.137-145, 1998.

GUERRA, I.M.F.; FADANELLI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A.P.L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S.O.P. e ECHEVERRIGARAY,S. *Aeromonas* Associated Diarrhoeal Disease In South Brazil: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Resistance. **Brazilian Journal of Microbiology** .v:38, p.638-643, 2007.

GUION, C. E.; OCHOA, T. J.; WALKER, C. M.; BARLETTA, F.; CLEARY, T. G. Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* by Use of Melting-Curve Analysis and Real-Time Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 46, n. 5, p. 1752-1757, 2008.

HÄNNINEN, M.L.; HIRVELÄ-KOSKI, V. Genetic diversity of atypical *Aeromonas salmonicida* studied by pulsed-field gel electrophoresis. **Epidemiology and Infection**. v.123, p.299-307, 1999.

HARRINGTON, S.M., DUDLEY, E.G., NATARO, J.P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**., v. 254, p. 12-8, 2006.

HIRANSUTHIKUL, N.; TANTISIRIWAT, W.; LERTUTSAHAKUL, K.; VIBHAGOOL, A.; BOONMA, P. Skin and Soft-Tissue Infections among Tsunami Survivors in Southern Thailand, **Clinical Infectious Diseases**. v.41, p.93-96, 2005.

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 diarreica aguda em São Bento do Uma, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 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.

HORNEMAN, AJ; ALI, A. *Aeromonas*. p. 658-665. In: Versalovic, J; Carroll, KC; Funke, G; Jorgensen, JH; Landry, ML; Warnock, DW. **Manual of Clinical Microbiology**. 10 ed. ASM Press, Washington, D.C. 2011.

JANDA, J. M. Recent Advances in the Study of the Taxonomy, Pathogenicity, and Infectious Syndromes Associated with the Genus *Aeromonas*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 397-410, 1991.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.332-344, 1998.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L.. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**. v.23, n.1, p. 35–73, 2010.

JANNES, G. and DE VOS, D. A Review of Current and Future Molecular Diagnostic Test for Use in the Microbiology Laboratory. In: O'CONNOR, L. **Methods in Molecular Biology - Diagnostic Bacteriology**. Totowa: Humana. Press, V. 345, Ed. 2, 2006 p.1-21 disponível em: Springer-Link Protocols – www.springerlink.com.

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

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microbiol.** v.2, p.123-140, 2004.

KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; BITZAN, M.; SCHMIDT, H. Epidemiology and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 34, p.229-243, 1999.

KHARDORI, N.; FAINSTEIN, V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. **Annual Review of Microbiology.** v.42, p. 395-419, 1988.

LAY JR., J. O.; HOLLAND, R.D. Rapid Identification of Bacteria Based on Spectral Patterns Using MALDI-TOFMS. **Methods in Molecular Biology.** v. 146, 2001.

LE BOUGUENEC, C., SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesions (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiology Letters,** v. 256, p. 185-94, 2006.

LIEBCHEN, A.; BENZ, I.; MELLMANN, A.; KARCH, H.; GOMES, T. A. T.; YAMAMOTO, D.; HERNANDES, R. T.; SAMPAIO, J.; SAMPAIO, S. C. F.; FRUTH, A.; SCHMIDT, A. Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Diarrhea in São Paulo, Brazil: Identification of Intermediate Virulence Factor Profiles by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology.** V. 49, n. 6, p. 2274–2278, 2011.

LIU, H.; DU, Z.; WANG, J.; YANG, R. Universal Sample Preparation Method for Characterization of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 73, n.6, p. 1899–1907, 2007.

LOPEZ-SAUCEDO, C.; CERNA, J. F.; VILLEGAS-SEPULVEDA, N.; THOMPSON, R.; VELAZQUEZ, R.; TORRES, J.; TARR, P. L.; ESTRADA-GARCIA, T. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases** v. 9, n.1, 2003.

LYNN, E. C.; CHUNG, M. C.; TSAI, W. C.; HAN, C. C. Identification of *Enterobacteriaceae* Bacteria by Direct Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Whole Cells. **Rapid Communication. Mass Spectrometry.** V. 13, p. 2022–2027, 1999.

MANDRELL, R.E.; HARDEN, L.A.; BATES, A.; MILLER, W.G.; WILLIAM F. HADDON, W.F.; FAGERQUIST C.K.. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry **Applied and Environmental Microbiology** . v. 71, n. 10, p. 6292–6307. 2005.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; 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. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v.42, n.3, p.412-421, 1992.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; ANTÓN, A. I.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Patterns of sequence variation in two regions of the 16s rRNA multigene family of *Escherichia coli*. **International Journal of Systematic Bacteriology** v.49, p. 601-610, 1999.

MARTINEZ-MURCIA, A .J.; SAAVEDRA, M. J.; MOTA, V. R.; MAIER T, STACKEBRANDT, E.; COUSIN, S. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.58,p.1169–1175, 2008.

MAZZEO, M.F.; SORRENTINO, A.; GAITA, M.;CACACE, G.; DI STASIO, M.; FACCHIANO, A.; COMI, G.; MALORNI, A.;SICILIANO, R.A. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for the Discrimination of Food-Borne Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, p. 1180–1189, 2006.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; MAZZOLLA, R.; FARINELLI, S.; D'ALO, F.; VITALI, M.; BISTONI, F. *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicaemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.727-730, 2003.

MURRAY, P.R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v.16, p. 1626-1630, 2010.

MUROI, M.; SHIMA, K.; NAKAGAWA, Y.; TANAMOTO, K. Application of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Discrimination of *Escherichia* Strains Possessing Highly Conserved Ribosomal RNA Gene Sequences. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.34, n.3, p.430-432, 2011.

NATARO, J. P., YIKANG, D., YINGKANG, D., WALKER, K. AggR, a transcriptional activador of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**., v. 176, p. 4691-9, 1994.

NATARO, J.P., STEINER, T., GUERRANT, R.L. Enteroagregative *Escherichia coli* . **Emerging. Infectious. Diseases**. v. 4, p. 251, 1998.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology Review**., v.11, p.142-201, 1998.

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

NATARO, J. P.; BOPP, C. A.; KAPER, J. B.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*.. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; WARNOCK, D. W. **Manual of Clinical Microbiology**. Ed. 10 ed.p.603-626.ASM Press, Washington, D.C. 2011.

OELSCHLAEGER, T. A.; DOBRINT, J. H. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V. 19, p. 517-521, 2002.

OLIVEIRA, F.A.; PALUDO, K.S.; AREND, L.N.V.S.; FARAH, S.M.S.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; SUREK, M.; PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C.M.T. . Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 1, 2011.

PABLOS, M.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. **International Journal of Food Microbiology**. v.135, p.158–164, 2009.

PARKER, J.L.; SHAW J.G.. *Aeromonas* spp. *Clinical Microbiology and Disease. Journal of Infection*. p1-10. 2010.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, 11:450-479, 1998.

PERCIVAL, S. *et.al. Aeromonas. Microbiology of waterborne diseases*. Ed: Elsevier Academic Press, Londres, UK, p.30-41, 2004.

PERSING, D.H; TENOVER, F.C.; VERSALOVICK, J.; TANG, Y.; UNGER, E.R.; RELMAN, D.A.; WHITE, T.J. **Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice**. ASM Pres, Washinton DC, p.185-195, 2004.

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 diarrheagenic *Escherichia coli* strains. **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. p. 95 – 115. In: Torres, AG (ed.).. Bentham eBooks. 2010.

PIGATTO, Caroline Peters; ITURRINO, Ruben Pablo Schocken; SOUZA, Emanuel Maltempi de; PEDROSA, Fabio de Oliveira; IRINO, Kinue; COMARELLA, Larissa; KATO, M. A.; FARAH, Sônia M S S; WARTH, José Francisco; PICHETH, C.M.T.F. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology** (Online), v. 54, p. 588-593, 2008.

QUADRI, F., SVENNERHOLM, A.M., FARUQUE, A. S., SACK, R.B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 465-83, 2005.

SAENZ, A. J.; PETERSEN, C. E.; VALENTINE, N. B.; GANTT, S. L.; JARMAN, K. H.; KINGSLEY, M. T.; WAHL, K. L. Reproducibility of matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. **Rapid Communication Mass Spectrometry** V. 13, p.1580-1585. 1999.

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

SAUER, S.; FREIWALD, A.; MAIER, T.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; KOSTRZEWA, M.; GEIDER, K. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. **PLoS ONE.** v. 3, p.1-10, 2008.

SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. **Nature Reviews.** v.8, p.75-82, 2010.

SEIBOLD, E.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; ZEMAN, M., PLETTSTOESSER, W. Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. **Journal of Clinical Microbiology.** p 1061–1069 Vol. 48, No. 4, 2010.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico.** Rio de Janeiro. Revinter, v. 246, p. 258, 2006.

SOHN, H.J.; NAM, D.H.; KIM, Y.S.; PAIK, H.J.; Endogenous *Aeromonas hydrophila* endophthalmitis in an immunocompromised patient **Korean Journal of Ophthalmology,** v.21, p.45-47, 2007.

SOLER, L.; YÁÑEZ, M. A.; CHACÓN, M.R.; AGUILERA ARREOLA, M.G.; CATALÁN, V.; FIGUERAS, M.J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 54.p. 1511–1519, 2004.

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 diarrhea and healthy controls. **Journal of Medical Microbiology.** v.59, p. 373-374, 2010.

TENA, D.; GONZÁLEZ-PRAETORIUS, A.; GIMENO, C.; PEREZ-POMATA, M. T.; BISQUERT, J. Infección Extraintestinal por *Aeromonas spp.*: Revision de 38 Casos. **Enferm Infeccion Microbiology Clinical.** V25, p. 235-241, 2007.

TONI, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F.O.; KLASSEN, G.; 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 diarrhea in Paraná State, Brazil. **Letters in Applied Microbiology,** v. 48, p. 645-647, 2009.

TRABULSI, L.R., KELLER, R., TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 8, p. 508, 2002.

TSCHÄPE, H.; FRUTH, A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: MÜLDORFER, I.; SCHÄFER, K.P. **Emerging Bacterial Pathogens.** v.8. SCHIMIDT, A.; (Ed) Contributions to Microbiology. Basel: Karger, p.1-11, 2001

VAANDRAGER, A.B., Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 230, p. 73-83, 2002.

VALENTINE, N. S. W.; WUNSCH, D.; PETERSEN, C.; WAHL, K. Effect of Culture Conditions on Microorganism Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, n.1, p. 58–64, 2005.

VANDAMME, P.A.R. Taxonomy and classification of bacteria. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, J.C.; Tenover, M.C. **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed., ASM Press, p. 275-290. 2007.

van VEEN H. W. Structural biology: Last of the multidrug transporters **Nature**. v. 467., p.926-7, 2010

VILA, J.; *et.al.* *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**. v.9, n.5, p.552-555, 2003.

VIZZOTTO, B.S. Caracterização Fenotípica e Molecular de Estirpes de *Aeromonas* Isoladas no Paraná no Período de 1999-2009. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFPR. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

WEILE, J. E KNABBE, C .Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.394, p.731–742, 2009.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 85, p. 11-19, 2008.

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

YAMAMOTO, K., A. KOGA, M. YAMAMOTO, Y. NISHI, T. TAMURA, Y. NOGI, AND M. MURAMATSU. Identification of a novel 70 kDa protein that binds to the core promoter element and is essential for ribosomal DNA transcription. **Nucleic Acids Research**. 28:1199-1205, 2000.