



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KAREN DE CASTRO BAUAB

**ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA
MEDIADA POR β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO
(ESBL) EM CEPAS DE *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA ISOLADAS DE ÁGUA PARA
CONSUMO HUMANO**

Londrina
2008

KAREN DE CASTRO BAUAB

**ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA
MEDIADA POR β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO
(ESBL) EM CEPAS DE *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA ISOLADAS DE ÁGUA PARA
CONSUMO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina
2008

KAREN DE CASTRO BAUAB

**ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA
MEDIADA POR β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO
(ESBL) EM CEPAS DE *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA ISOLADAS DE ÁGUA PARA
CONSUMO HUMANO**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis

Prof. Dr. Emerson José Venâncio

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina, 28 de março de 2008.

DEDICATÓRIA

Por representarem o que há de mais importante e sólido em minha vida, dedico este trabalho aos anjos inundados de amor e luz, os quais Deus, em sua infinita bondade, deu a mim o privilégio de chamá-los simplesmente de Pai e Mãe.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Bauab Neto e Carla M. M. de Castro Bauab, pelo amor e apoio incondicionais, pelos valiosos conselhos e por terem feito de tudo para que eu pudesse realizar mais este sonho.

À minha orientadora e amiga, Prof^{fa}. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo, pelo apoio e compreensão, pelos ensinamentos, pela paciência e pelos inúmeros momentos de alegria compartilhados.

À Prof^{fa}. Dr^a. Halha Ostrensky Saridakis, pelo carinho e preocupação que constantemente manifestou, pela amizade e por nos proporcionar momentos tão agradáveis e prazerosos nas confraternizações em sua casa.

Ao Prof. Dr. Emerson José Venâncio, por participar da minha banca de qualificação e por ter estado sempre solícito, tirando dúvidas e dando sugestões.

Aos animados companheiros de laboratório, Silvia Cestari, Carlos Alfredo Queiroz, Bárbara Moriel, Michele Siewert, Tatiane Yumi, Rafael Penha, André Lengert, Eduardo Feniman e Claci Sandra pela amizade, bate-papos, pelos tantos momentos alegres e por toda ajuda na realização dos experimentos.

Aos amigos Alessandra Nimitz e Rafael Osti de Melo, pelas inúmeras conversas no corredor, pelas caronas e boas risadas. À amiga não menos especial, Kátia Oshiro, pelo carinho e apoio de sempre.

Às ex-colegas de laboratório, que seguiram seus caminhos, e mesmo de longe me conferiram incentivo, carinho, palavras amigas e sugestões: Paula Ignez Barbosa, Raquel Girardello, Kathelin Lascowiski, Ilmara Varotto, Eliana Vespero e Cláudia Ross.

Ao grande amigo, sempre presente, Renato Fochi Filho, por me ajudar, aconselhar, amparar, estimular, e principalmente, pela paciência nos meus maus momentos.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Microbiologia, por compartilharem seus conhecimentos.

Aos funcionários da UEL, pelo ótimo convívio e principalmente pelo auxílio na organização e preparo dos materiais utilizados na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha afilhada, Amanda Victória, que mesmo tão pequenina, por tantas vezes foi capaz de revigorar minhas forças me abrindo um lindo sorriso ou tagarelado palavrinhas, que mesmo faltando letras, tocavam suavemente meu coração.

Ao Pai celestial por me permitir a realização deste sonho, por ter estado o tempo todo ao meu lado, me protegendo, me dando força e soprando baixinho no meu ouvido: “Levanta essa cabeça, menina... Fica calma... Você vai conseguir...”.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu mais profundo e sincero: **Muito Obrigada!**

"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

"A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva os homens a se curvarem diante da divindade."

Voltaire

BAUAB, Karen de Castro. **Estudo de fatores de virulência e resistência mediada por β -lactamases de espectro ampliado (esbl) em cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa isoladas de água para consumo humano.** 2008. 46f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A diarreia continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento e uma grande porcentagem é causada por *Escherichia coli* diarreiogênica. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) é um patógeno bacteriano emergente que causa diarreia aguda e persistente entre crianças e pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana. EAEC é reconhecida por apresentar um padrão de adesão agregativo (AA) ou “tijolos empilhados” em células epiteliais. O objetivo desse trabalho foi estudar a prevalência, fatores de virulência e produção de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) em EAEC isoladas de amostras de água para consumo coletadas de 27 cidades norte do estado do Paraná – Brasil, no período de Fevereiro de 2005 a Janeiro de 2006. Das 279 cepas de *E. coli* isoladas, 152 (54,48%) apresentaram padrão AA no ensaio com células HEp-2 e estas foram testadas para a presença dos genes de virulência (*aatA*, *aap*, *aggR*, *astA* e *hlyA*) e fenotipicamente para a produção de enterohemolisinas, capacidade de aderência em microplaca de poliestireno e produção de ESBL. As 152 cepas de EAEC foram negativas para a presença dos genes *aggR*, *aap* e *aatA*. Duas cepas (1,32%) possuíam o gene *astA* e 9 (5,92%) o *hlyA*. A presença de enterohemolisina foi confirmada pelo teste em placas de ágar sangue. No teste de adesão em poliestireno, foram encontradas 125 cepas (82,78%) fracamente aderentes, 14 (9,27%) não aderentes, 5 (3,31%) moderadamente aderentes e 5 (3,31%) fortemente aderentes. Sessenta e quatro (42,1%) cepas foram positivas no teste de triagem para a presença de ESBL, das quais 29 cepas foram confirmadas pelo teste de disco combinado. Esses resultados sugerem que outros fatores de virulência podem estar relacionados com o padrão AA. A presença de ESBL em 19% das EAEC isoladas de água para consumo humano representa um problema para o desenvolvimento de infecções intestinais por EAEC multirresistentes e para a disseminação de genes de resistência no meio ambiente.

Palavras-chave: EAEC. Água para consumo. Fatores de virulência. ESBL.

BAUAB, Karen de Castro. **Estudo de fatores de virulência e resistência mediada por β -lactamases de espectro ampliado (esbl) em cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa isoladas de água para consumo humano.** 2008. 46f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Diarrhea remains one of the main sources of morbidity and mortality both in developed and in developing countries, and a large percentage is caused by diarrheagenic *Escherichia coli*. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) is an emergent bacterial pathogen that causes acute and persistent diarrhea among children and human immunodeficiency virus-infected patients. EAEC strains are recognized by their make aggregative adherence (AA) or “stacked-brick” pattern to epithelial cells. The objective of this work were study the prevalence, virulence factors and production of extend spectrum β -lactamases (ESBL) in EAEC isolated from samples of drinking water collected from 27 cities from the north of Parana states - Brazil, in the period from February 2005 to January 2006. From 279 *E. coli* strains isolated, 152 (54.48%) showed AA pattern in HEp-2 cell adherence assay and these were tested for the presence of virulence genes (*aatA*, *aap*, *aggR*, *astA* and *hlyA*) and phenotypically for production of enterohemolysin, capacity of adherence in polystyrene microtiter plates and production of ESBL. All the 152 EAEC strains were negative from the presence of the genes *aggR* (classifieds as atypical EAEC), *aap* and *aatA*. Two strains (1.32%) had *astA* gene and 9 (5.92%) had *hyA* gene. The presence of enterohemolysin were confirmed by blood agar test. In polystyrene adhesion test, were found 125 strains (82.78%) weakly adherents, 14 (9.27%) non adherents, 5 strains (3.31%) moderately adherents and 5 (3.31%) strongly adherents. Sixty-four strains (42.10%) were positive in the screening test for presence of ESBL, where 29 (45.31%) were confirmed by the double disk test. These results suggest that others virulence factors can be involved in AA pattern. The presence of ESBL in 19% of EAEC isolated from drinking water represents a problem for development of EAEC multiresistance intestinal infections and for dissemination of resistance genes in environment.

Keywords: EAEC. Drinking water. Virulence factors. ESBL.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	11
2.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC)	13
2.3 RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS	16
2.4 β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBLs)	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
REFERÊNCIAS	21
ARTIGO – “Study of virulence factors and ESBL in Enteroagreggative <i>Escherichia coli</i> strains isolated from human consume water”	31

1 INTRODUÇÃO

A água representa um importante veículo de contaminação por microrganismos patogênicos, logo, o controle da qualidade da água consumida pela população é uma medida essencial para a saúde pública.

No Brasil, *Escherichia coli* é utilizada como parâmetro de controle microbiológico da água para consumo. Sua presença indica contaminação recente por fezes, o que pode representar uma possível presença de vários outros microrganismos intestinais, não somente bactérias, como também protozoários e vírus.

E. coli diarreiogênicas representam um grande grupo dentro das *E. coli* patogênicas e são subdivididas em: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* que adere difusamente).

EAEC é um patógeno emergente que causa diarreia aguda e crônica, principalmente em crianças e em pacientes imunodeficientes.

Vários genes de fatores de virulência de EAEC já foram descritos, a maioria deles localizados em um plasmídeo denominado de plasmídeo AA, porém nenhum desses genes é considerado como marcador dessa classe.

Os objetivos do presente estudo incluem a avaliação da prevalência de EAEC em amostras de água para consumo de 27 cidades do norte do Paraná, a pesquisa de fatores de virulência e o perfil de resistência a antimicrobianos nas cepas isoladas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *ESCHERICHIA COLI*

E. coli é um microrganismo que faz parte da microbiota intestinal humana proporcionando benefícios para seus hospedeiros (DRASAR; HILL, 1994). Entretanto, várias cepas ao adquirir fatores de virulência específicos, aumentam a habilidade de se adaptar a novos nichos, sendo assim capazes de causar uma variedade de infecções como: infecção entérica, infecção do trato urinário e sepse e/ou meningite (NATARO; KAPER, 1998).

A diarreia bacteriana é a causa mais comum de mortalidade em crianças nos países em desenvolvimento (NATARO et al., 1987; CLARKE, 2001), nos quais *E. coli* têm um papel importante na etiologia da diarreia infantil (TOLEDO et al., 1983; GOMES et al., 1989; ROSA et al., 1998).

Acredita-se que a ampla disseminação de *E. coli* pelos animais no meio ambiente resulta na contaminação de água e alimentos e conseqüentemente em infecção do homem (RASMUSSEN; CASEY, 2001).

A presença de *E. coli* em alimentos e na água constitui uma preocupação significativa para saúde pública. A transmissão de fatores de virulência entre as cepas contribui para sua patogenicidade, e aumenta sua diversidade no ambiente (DONNENBERG; WHITTAM, 2001).

E. coli também é utilizada como parâmetro de controle da qualidade da água para consumo, tendo em vista todas as implicações que a presença desse microrganismo pode causar à saúde do homem (FARNLEITNER et al., 2000).

O Decreto nº. 5.440, de 4 de maio de 2005 (BRASIL), traz que *E. coli* é considerada o mais específico indicador de contaminação fecal, e de eventual presença de organismos patogênicos; e que, a água para consumo humano, deve obrigatoriamente, não possuir coliformes fecais. Cabe a cada município o tratamento da água, o controle microbiológico e físico-químico para o consumo de sua população.

Numerosos surtos de doenças, devido à contaminação da água de rede municipal com microrganismos, como *E. coli*, vem sendo reportados no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (MACKENZIE et al., 2004), mas também em países desenvolvidos (SWERDLOW et al., 1992; ITOH et al., 1997; MEUSBURGER et al., 2007).

Segundo Fewtrell e Bartram (2001), a qualidade da água para consumo humano está diretamente relacionado à saúde pública. Mesmo nas áreas geográficas onde investimentos significativos são feitos para proteger a qualidade da água, a contaminação fecal representa uma ameaça.

Estudos de fatores de virulência em cepas de *E. coli* isoladas de água potável e um controle microbiológico da água fornecida à população são importantes na prevenção de surtos de infecções relacionados à água do sistema de abastecimento público (DONNENBERG; WHITTAM, 2001).

Uma das prioridades na segurança de alimentos, e de água, é a investigação da sensibilidade a antimicrobianos das cepas bacterianas isoladas desses. Surtos de intoxicação alimentar em humanos são causados, principalmente, por microrganismos multirresistentes a drogas (DONKERSGOED et al., 2003).

Cepas de *E. coli* associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas e estão agrupadas em seis categorias, considerando os seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998). Essas categorias de *E. coli* diarreiogênicas são classificadas como: EPEC, ETEC, EIEC, STEC, EAEC e DAEC. Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, torna-se evidente que algumas categorias incluem microrganismos bastante diferentes. Desta forma, EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria de STEC (KAPER et al., 2004).

2.2 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

EAEC foi denominada por Nataro et al. (1987), para caracterizar aquelas amostras que apresentavam um padrão de adesão em células HEp-2, denominado de aderência agregativa (AA). No padrão AA as bactérias apresentam-se aderidas umas às outras, tanto na superfície celular como em regiões da lamínula livre de células, em um arranjo semelhante a tijolos empilhados.

Variações do padrão AA, originalmente descrito, foram encontrados em amostras de EAEC. Estas variações consistem de adesão das bactérias preferencialmente à superfície celular ou preferencialmente à lamínula. (KNUTTON et al., 1992; PAUL et al., 1994; GIOPPPO et al., 2000), descreveram uma variante do padrão AA, a adesão formando cordões. Monteiro-Neto et al. (1997) verificaram que para algumas amostras de EAEC, o fenótipo AA só foi evidenciado após um período adicional de mais 3 horas de incubação bactéria-célula.

EAEC é considerada um patógeno diarreiogênico emergente (NATARO et al., 1994; OKEKE; NATARO, 2001; PABST et al., 2003; VILLASECA et al., 2005; WEINTRAUB, 2007) associado como um importante agente de diarreia persistente, ou seja, com duração igual ou superior a 14 dias (BHAN et al., 1989; WANKE et al., 1991; LIMA et al., 1992; BHATNAGAR et al., 1993; FANG et al., 1995; KAPER et al., 2004).

Embora a maioria dos estudos epidemiológicos associe EAEC à diarreia persistente (WANKE et al., 1991; LIMA et al., 1992; CRAVIOTO et al., 1991; BHATNAGAR et al., 1993; FANG et al., 1995) um número crescente de trabalhos vêm relacionando esta classe de *E. coli* diarreiogênica à diarreia aguda (HAIDER et al., 1991; SMITH et al., 1994; COBELJIC et al., 1996; SMITH et al., 1997; ITOH et al., 1997; SCALETSKY et al., 2002).

EAEC também têm sido isoladas de fezes de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (GERMANI et al., 1998; DURRER et al., 2000; KAHALI et al., 2004; WEINTRAUB, 2007) e associada à diarreia do viajante (GASCÓN et al., 1998; SCHULTSZ et al., 2000; ADACHI et al., 2001).

Sobieszczanska et al. (2007) estudaram amostras fecais de pacientes com Síndrome do Intestino Irritável e observaram que cepas de EAEC são as mais frequentemente isoladas, em comparação com o grupo controle.

A doença típica causada por EAEC é uma gastroenterite caracterizada por diarreia secretora, líquida, mucóide, com presença de febre baixa e pouco ou nenhum vômito (BHAN et al., 1989; PAUL et al., 1994; NATARO et al., 1995).

Vários estudos sugerem que pacientes infectados com EAEC manifestam uma inflamação intestinal marcada pela presença de lactoferrina fecal e citocinas pró-inflamatórias, especialmente a interleucina-8 (IL-8) (STEINER et al., 1998; GREENBERG et al., 2002; HARRINGTON et al., 2006).

Experimentos com espécimes de intestino humano indicam que EAEC induz uma ligeira, mas significativa, destruição da mucosa (HICKS et al., 1996). EAEC adere na mucosa intestinal, estimulando a secreção de muco, formando um biofilme agregado espesso (HICKS et al., 1996; NATARO et al., 1998; MOHAMED et al., 2007).

Depois da adesão a superfície, as bactérias se multiplicam e aderem umas às outras através de substâncias exopoliméricas e recrutam mais células bacterianas, formando microcolônias intercaladas com canais de filamentos fluídicos, conhecido como biofilme. Esse biofilme restringe a penetração de antimicrobianos, a ação do sistema imune do hospedeiro e permite a permuta genética entre as cepas, (COSTERTON et al., 1999) contribuindo para a infecção crônica (MOHAMED et al., 2007).

A desnutrição predispõe à diarreia persistente (SCHORLING et al., 1990; GUERRANT et al., 1992), contudo, parece plausível que a colonização assintomática por EAEC pode levar a desnutrição devido ao aumento da demanda metabólica secundária para a inflamação intestinal, danos persistentes à mucosa por citocinas e/ou a presença de uma barreira para a absorção de nutrientes imposta pelo biofilme (muco/bacteriano) (NATARO et al., 1998).

Muitos dos fatores de virulência de EAEC estão localizados em um plasmídeo de 60 a 65-MDa, chamado de plasmídeo AA, incluindo as adesinas fimbriais I, II e III (NATARO et al., 1992; CZECZULIN et al., 1997; BERNIER et al., 2002), a toxina termo-estável enteroagregativa (EAST1) (SAVARINO et al., 1991), a

toxina codificada por plasmídeo (Pet) (ESLAVA, et al., 1998), uma proteína envolvida na anti-agregação (dispersina) (SHEIKH et al., 2002) e o AggR, que é um ativador transcricional pertencente a família AraC (NATARO; KAPER, 1998).

Em 1995, Schmidt et al. desenvolveram um oligonucleotídeo iniciador para o gene *aatA* a partir da sonda EAEC (fragmento do plasmídeo AA).

Os determinantes genéticos envolvidos na produção do biofilme de EAEC não estão bem compreendidos. Entretanto, fatores de virulência como *aggA* (codifica a subunidade estrutural da fímbria tipo I de EAEC), *aap* (codifica a dispersina) e *aggR* (ativador transcricional) são importantes para a aderência na mucosa intestinal e estimulação da formação do biofilme (SHEIKH et al., 2001; MOREIRA et al., 2003; WAKIMOTO et al., 2004; DUDLEY et al., 2006).

A dispersina é uma proteína secretada pela própria EAEC em sua superfície e tem habilidade para neutralizar a forte carga negativa do LPS (lipopolissacarídeo), deixando assim que as AAFs (adesinas fimbriais de EAEC), que tem forte carga positiva, se desliguem da superfície e assim, a bactéria possa migrar e colonizar outros sítios (HARRINGTON et al., 2006).

Em 2004, Nataro sugeriu o termo EAEC típica para as cepas que carregam o regulador AggR. Recentemente, Dudley et al. (2006) mostraram que o ativador transcricional AggR controla não somente os genes do plasmídeo AA como também alguns genes cromossomais.

Cerna et al. (2003) desenvolveram uma técnica de multiplex PCR para detectar EAEC, utilizando três genes do plasmídeo AA (*aat*, *aap* e *aggR*), o que representa um método fácil, rápido e sensível, porém, dificilmente detecta EAEC atípicas. Desta forma, o “padrão ouro” para detecção de EAEC ainda é o teste de adesão em células HEp-2.

Como não há um marcador genético para a categoria EAEC, sua detecção através de um perfil genotípico é bastante complicada. Além disso, a sorotipagem de EAEC também é problemática. Devido ao seu fenótipo agregativo, muitas cepas são auto-aglutinantes e são frequentemente descritas na literatura como não tipáveis para o antígeno somático (antígeno O) (WEINTRAUB, 2007).

Uber et al. (2006) realizaram um estudo com amostras de EAEC isoladas de humanos e animais (vitelos, porcos e cavalos) comparando-as quanto à presença de genes de fatores de virulência. Nenhuma cepa isolada dos animais que

apresentava o padrão AA hibridizou com o gene regulador *aggR*, sendo consideradas, então, EAEC atípicas e 63% das cepas isoladas de fezes humanas foram positivas para o gene *aggR*, portanto, classificadas como EAEC típicas.

De acordo com os trabalhos realizados por Itoh et al. (1997) e Adachi et al. (2002), uma das principais fontes de infecção humana por EAEC está associada com a ingestão de água e alimentos contaminados.

2.3 RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS

A resistência aos antimicrobianos é o melhor exemplo da rápida adaptação do microrganismo a um novo ecossistema. A habilidade da bactéria em ampliar seu nicho ecológico, também na presença de determinadas drogas, pode explicar a aquisição de genes por transferência horizontal de material genético e/ou pelo acúmulo de mutações pontuais, levando à modificações de genes existentes (SUNDSTROM, 1998; CARATOLLI, 2001).

Vários mecanismos estão envolvidos na resistência bacteriana aos antimicrobianos, entre eles: alteração conformacional e bioquímica do sítio alvo; alteração na permeabilidade da parede celular; efluxo ativo e inativação enzimática do antimicrobiano (SANDERS; SANDERS, 1992; LIVERMORE, 1998).

As taxas de resistência bacteriana estão intimamente relacionadas às normas de utilização de agentes antimicrobianos em uma comunidade. O uso indiscriminado dessas drogas tem sido um fator importante no desenvolvimento de resistência em praticamente, todas as espécies bacterianas (SHAH et al., 2004; COLODNER, 2005).

Bactérias naturalmente resistentes podem ser selecionadas durante o uso de determinados antimicrobianos e além disso, genes que codificam a resistência podem ser adquiridos de outras cepas bacterianas (LIVERMORE, 1991; SANDERS; SANDERS, 1992).

Em suma, pode-se dizer que a resistência ocorre pela pressão seletiva de antimicrobianos, pela disseminação clonal e/ou pela transferência horizontal de genes de resistência (WITTE, 2004).

O principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos β -lactâmicos é decorrente da produção de β -lactamases, que são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, impossibilitando assim, a atividade antimicrobiana da droga (LIVERMORE, 1995).

Com a introdução do uso clínico de β -lactâmicos de amplo espectro em 1978 na Europa e em 1981 nos Estados Unidos, os microrganismos quando submetidos a tratamento com estes antimicrobianos, sofreram pressão seletiva para desenvolver resistência. Como conseqüência, na década de 80, microrganismos que possuíam β -lactamases mediadas pelo gene *tem* desenvolveram resistência a cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos (NAUMOVSKI et al., 1992; MEYER et al., 1993).

2.4 β - LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBLs)

Por definição, ESBLs constituem um grupo de enzimas derivadas das β -lactamases clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV e conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro, penicilinas e monobactâmicos (aztreonam), sendo que essas cepas permanecem sensíveis às cefamicinas (cefoxitina e cefotetan) e aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) (WILLIAMS, 1997; SOUZA et al., 2004).

A característica fenotípica importante das ESBLs é que geralmente permanecem sensíveis à ação de inibidores de β -lactamases como sulbactam e ácido clavulânico descritos na década de 70 e tazobactam descrito na década de 80. Esses inibidores formam um complexo protéico com a β -lactamase, bloqueando, desta maneira, a atividade hidrolítica dessas enzimas (WILLIAMS, 1997).

ESBLs são codificadas por genes presentes em grandes plasmídeos, de 80 a 300kb, os quais podem ser transferidos entre diferentes espécies bacterianas, facilitando sua disseminação. Em diversos casos, esses plasmídeos codificam ainda outros genes de resistência antimicrobiana, sendo comum que ocorra concomitantemente a expressão de ESBLs e resistência aos

aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina, cloranfenicol e quinolonas (WINOKUR et al., 2001).

A β -lactamase TEM-1 é a enzima mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas e foi isolada em Atenas em 1963. O termo TEM deriva de “Temoniera”, nome da paciente de cujo material clínico, uma hemocultura, foi isolada a primeira cepa de *E. coli* produtora dessa enzima. TEM-2, a primeira derivada de TEM-1, tem um único aminoácido substituído na molécula da β -lactamase original. Isto origina a mudança no ponto isoelétrico de 5,4 para 5,6, mas não altera o substrato. TEM-3 foi relatada em 1987 e desde então, foi observado o aumento rápido no número e nas variantes de espectro ampliado do tipo TEM. A combinação na mudança dos aminoácidos resulta em várias sutis alterações no fenótipo ESBL, como a capacidade de hidrolizar oximino-cefalosporinas, tais como ceftazidima e cefotaxima (HERITAGE et al., 1999; BRADFORD, 2001; MACK; MACK, 2003). β -lactamases do tipo TEM são encontradas em todos os países, porém na América do Norte esta enzima é predominante (PATERSON; BONOMO, 2005).

No início dos anos 70, TEM-1 já havia se disseminado em 30-50% dos isolados de *E. coli* e foi encontrada em outras enterobactérias, e em meados dos anos 70 foi disseminada entre *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (LIVERMORE, 2008).

Como ocorre com TEM, as ESBLs do tipo SHV tem uma ou mais substituição de aminoácidos em torno do sitio de ativação. O nome SHV deriva dessa propriedade da enzima TEM, porém com variável sulfidríla – *Sulphydryl Variable* (PATERSON; BONOMO, 2005). Mais de 50 variedades de SHV são conhecidas atualmente com base nas combinações únicas da substituição de aminoácidos. As ESBLs do tipo SHV, são predominantes nos isolados clínicos da Europa e América (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005) e têm sido a causa de surtos não só com *Enterobacteriaceae*, mas também com *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp (POIREL et al., 2004; HUANG et al., 2004).

A primeira enzima CTX-M foi isolada na Alemanha em 1989, por Bauernfeind et al. (1990) que relataram o isolamento de uma cepa de *E. coli* resistente a cefotaxima, cuja ESBL não era TEM nem SHV, sendo então designada CTX-M-1, devido a sua capacidade de hidrolizar a cefotaxima.

Enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs) têm sido isoladas com maior frequência em amostras procedentes de pacientes hospitalizados, porém também podem ser encontradas em amostras de origem comunitária. O tubo digestivo atua como reservatório potencial destes microrganismos multirresistentes, e oferece habitat adequado para que a resistência se transmita a outras espécies bacterianas (SOUZA et al., 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a importância das diarreias causadas por *E. coli* em nosso meio e tendo em vista a importância da detecção e caracterização de agentes emergentes, o objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de EAEC entre as cepas de *E. coli*, isoladas de águas tratadas e não tratadas destinadas ao consumo humano, pertencentes a 27 municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o padrão de adesão em células HEp-2;
- Detectar genes associados a fatores de virulência de EAEC através da PCR;
- Verificar a capacidade de adesão em poliestireno das cepas de EAEC isoladas;
- Detectar hemolisinas das cepas de EAEC em placas de ágar sangue de carneiro a 5%;
- Pesquisar a resistência aos antimicrobianos mediada por β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs).

REFERÊNCIAS

ADACHI, J.A.; JIANG, Z.D.; MATHEWSON, J.J.; VERENKAR, M.P.; THOMPSON, S.; MARTINEZ-SANDOVAL, F.; ERICSSON, C.D.; DUPONT, H.L. (2001) Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clin. Infect. Dis.** 32, 1706-1709.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. (1990) A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection.**, 18, 294-298.

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

BHAN, M.K.; RAJ, P.; LEVINE, M.M.; KAPER, J.B.; BHANDARI, N.; SRIVASTAVA, R.; KUMAR, R.; SAZAWAL, S. (1989) Enteroaggregative *Escherichia coli* Associated with Persistent Diarrhea in a Cohort of Rural Children in India. **J. Infect. Dis.** 159, 1061-1064.

BHATNAGAR, S.; BHAN, M.K.; SOMMERFELT, H.; SAZAWAL, S.; KUMAR, R.; SAIANI, S. (1993) Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a New Pathogen Causing Acute and Persistent Diarrhea. **Sacand. J. Infec. Dis.** 25, 579-583.

BRADFORD, P.A. (2001) Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14, 933-951.

BRASIL. Decreto nº. 5.440, de 4 de maio de 2005. Estabelece definições e procedimentos sobre o controle de qualidade da água de sistemas de abastecimento e institui mecanismos e instrumentos para divulgação de informação ao consumidor sobre a qualidade da água para consumo humano.. **Diário Oficial da República Federal do Brasil**. Brasília, 4 de maio de 2005; 184º da Independência e 117º da República.

CARATOLLI, A. (2001) Importance of integrons in diffusion of resistance. **Vet. Res.**, 32, 243-259.

CERNA, J.F.; NATARO, J.P.; ESTRADA-GARCIA, T. (2003) Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.** 41, 2138-2140.

CLARKE, S. C. (2001) Diarrhoeagenic *Escherichia coli*: an emerging problem? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 41:93-98

COBELJIC, M.; MILJKOVIC-SELIMOVIC, B.; PAUNOVIC-TODOSIJEVIC, D.; VELICKOVIC, Z.; LEPSANOVIC, Z.; ZEC, N.; SAVIC, D.; ILIC, R.; KONSTANTINOVIC, S.; JOVANOVIC, B.; KOSTIC, V. (1996) Enteroaggregative *Escherichia coli* Associated with an Outbreak of Diarrhoea in a Neonatal Nursery Ward. **Epidemiol. Infect.** 117, 11-16.

COLODNER, R. (2005) Extended-spectrum β -lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. **Am. J. Infect. Control.**, 33, 104-107.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science** 284, 1318–1322.

CZECZULIN, J.R.; BALEPUR, S; HICKS, S. et al. (1997) Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 65, 4135-4145.

DONKERSGOED, J.V.; MANNINEN, K.; POTTER, A.; MCEWEN, S.; BOHAYCHUK, V.; KLASHINSKY, S.; DECKERT, A.; IRWIN, R. (2003) Antimicrobial susceptibility of hazard analysis critical control point *Escherichia coli* isolates from federally inspected beef processing plants in Alberta, Saskatchewan, and Ontario. **Can. Vet. J.** 7, 723-728.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T.S. (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Clin. Investig.** 107, 539–548.

DRASAR, BS.; HILL, MJ. (1994) Human intestinal flora. **London, Un. Kingdom-Academic Press Ltd.** 7, 36–43.

DUDLEY, E. G.; ABE, C.; GHIGO, J. M.; LATOUR-LAMBERT, P.; HORMAZABAL, J. C.; NATARO J. P (2006) An IncI1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.** 74, 2102–2114.

DURRER, P.; ZBINDEN, R.; FLEISH, F.; ALTWEEGG, M.; LANDERERBER, B.; KARSH, H.; WEBER, R. (2000) Intestinal Infection due to Enteroaggregative *Escherichia coli* Among Human Immunodeficiency Virus-infected Persons. **J. Infect. Dis.** 182, 1540-1544.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, F.; CZECZULIN J.H.; HENDERSON, I.R.; CRAVIOTO A.; NATARO, J.P. (1998) Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 66, 3155-3163.

FANG, G.D.; LIMA, A.A.M.; MERTINS, C.V.; NATARO, J.P.; GUERRANT, R.L. (1995) Etiology and Epidemiology of Persistent Diarrhea in Northeastern Brazil: a Hospital-based Prospective, Case-control Study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 21, 137-144.

FARNLEITNER, A. H.; KREUZINGER, N.; GRILLENBERGER, S.; KAVKA, G.G.; RATH, J.; MACH, R. L. (2000) Simultaneous Detection and Differentiation of *Escherichia coli* Populations from Environmental Freshwaters by Means of Sequence Variations in a Fragment of the b-D-Glucuronidase Gene. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 1340–1346.

FEWTRELL, L., AND J. BARTRAM. 2001. Water quality: Guidelines, standards and health. **IWA Publ.**, London.

GASCÓN, J.; VARGAS, M.; QUINTO, L.; CORACHAN, M.; JIMENEZ DE ANTA, M.T.; VILA, J. (1998) Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains as a Cause of a Traveler's Diarrhea: a Case-control Study. **J. Infect. Dis.** 177, 1409-1412.

GERMANI, Y.; MINSSART, P.; VOHITO, M.; GLAZIOU, P.; HOCQUET, D. BERTHELEMY, P.; MORVAN, J. (1998) Etiologies of Acute, Persistent and Dysenteric Diarrheas in Adults in Bangui, Central African Republic, in Relation to Human Immunodeficiency Virus Serostatus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 59, 1008-1014.

GIOPPO, N.M.R.; ELIAS, W.P.; VIDOTTO, M.C.; LINHARES, R.E.; SARIDAKIS, H.O.; GOMES, T.A.T.; TRABULSI, L.R.; PELAYO, J.S. (2000) Prevalence of HEp-2 cell adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.** 190, 293-298.

GOMES, T.A.T.; BLAKE, P.A.; TRABULSI, L.R. (1989) Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. **J. Clin. Microbiol.** 27, 266-269.

GREENBERG, D.E; JIANG, Z.; STEFFEN, R.; VERENKER, M.P.; DUPONT, H.L. (2002) Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** 185, 944-949.

GUERRANT, R.; SCHORLING, J.; MCAULIFFE, J.; SOUZA, M.D. (1992) Diarrhea as a cause and effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 47, 28-35.

HAIDER, K.; FARUQUE, S.M.; SHARID, N.S.; ALBERT, M.J.; NAHAR, S.; MALEK, A.; TZIPORI, S.; ALAM, A.N. (1991) Enteroaggregative *Escherichia coli* Infections in Bangladeshi Children: Clinical and microbiological Features. **J. Diarrhoeal Dis. Res.** 9, 318-322.

HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, E.G.; NATARO, J.P. (2006) Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.** 254, 12-18.

HERITAGE, J.; M'ZALI, F.H.; GASCOYNE-BINZI, D.; HAWKEY, P.M. (1999) Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in Gram negative bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.**, 44, 309-318.

HICKS, S.; CANDY, D.C.; PHILLIPS, A.D. (1996) Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infect. Immun.** 64, 4751-4760.

HUANG, Z.M.; MAO, P.H.; CHEN, Y.; WU, L.; WU, J. (2004) Study on the molecular epidemiology of SHV type β -lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.**, 2, 5425-427.

ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; EZAKI, T. (1997) Laboratory Investigation of Enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 Associated with a Massive Outbreak of Gastrointestinal Illness. **J. Clin. Microbiol.** 35, 2546-2550.

JACOBY, G.A.; MUNOZ-PRICE, L.S. (2005) The new β -lactamases. **N. Engl. J. Med.** 352, 380-391.

KAHALI, S.; SARKAR, B.; RAJENDRAN, K.; KHANAM, J.; YAMASAKI, S.; NANDY, R.K.; BRATTACHARYA, S.K.; RAMAMURTHY, T. (2004) Virulence Characteristics and Molecular Epidemiology of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates from Hospitalized Diarrheal Patients, in Kolkata, India. **J. Clin. Microbiol.** 42, 4111-4120.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. **N. Rev. Microbiol.** 2, 123-138.

KNUTTON, S.; SHAW, R.K; BHAN, M.K., SMITH, H.R., MCCONNELL, M.M.; CHEASTY, T.; WILLIAMS, P.H.; BALDWIN, T.J. (1992) Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere *in vitro* to human intestinal mucosa. **Infect. Immun.** 60, 2083-2091.

LIMA, A.A.M.; FANG, G.; SCHORLING, J.B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J.F.; MOTA, S.; LEITER, R.; GUERRANT, R.L. (1992) Persistent Diarrhea in Northeast Brazil: Etiologies and Interactions with Malnutrition. **Acta. Paediatr. Suppl.** 381, 39-44.

LIVERMORE, D.M. (1991) Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. **J. Infect. Dis.**, 78, 7-16.

LIVERMORE, D.M. (1995) β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, 8, 557-584.

LIVERMORE, D.M. (1998) β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. **J. Antimicrob. Rev.** 8, 557-584.

LIVERMORE, D.M. (2008) Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Eur. Soc. Clin Microbiol. Infect. Dis.** 14, 03-10.

MACK, E.; MACK, D. (2003) Extended-spectrum-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **J. Infect.**, 47, 273-295.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.R.; ADDISS, J.J.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVIS, J.P. (2004) A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidiosis infection transmitted through a public water supply. **N. Engl. J. Med.** 331, 161–167.

MEUSBURGER, S.; REICHART, S.; KAPFER S.; SCHABLEGER K.; FRETZ, R.; ALLERBERGER, F. (2007) Outbreak of acute gastroenteritis of unknown etiology caused by contaminated drinking water in a rural village in Austria, August 2006. **Wien Klin Wochenschr.** 119, 717-721.

MEYER, K.S; URBAN, C.; EAGAN, J.; BERGER, B.J.; RAHAL, J.J. (1993) Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection resistance to late-generation cephalosporins. **Ann. Intern. Med.**, 119, 353-358.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B.; JIANG, Z.; DUPONT, H.L.; NATARO, J.P.; BELKINDGERSON, J.; OKHUYSEN, P.C. (2007) Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **J. Clin. Microbiol.** 45, 121-126

MONTEIRO-NETO V.; CAMPOS, L.C.; FERREIRA, A.J.P.; GOMES, T.A.T. TRABULSI, L.R. (1997) Virulence Properties of *Escherichia coli* O111:H12 strains. **FEMS Microbiol. Lett.** 146, 123-128.

MOREIRA, C.G.; CARNEIRO, S.M.; NATARO, J.P.; TRABULSI, L.R.; ELIAS, W.P. (2003) Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 226, 79–85.

NATARO, J.P. (2004) Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infections* 6 (Scheld W.M., Hughes J.M., Murray B.E. eds) ASM Press, Washington, DC.

NATARO, J.P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S.J.; GUERS, L.D.; LEVINE, M.M.; TACKET, C.O. (1995) Heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Demonstrated in Volunteers. **J. Infect. Dis.** 171, 465-468.

NATARO, J.P.; DENG, Y.; MANEVAL, D.R.; GERMAN, A.L.; MARTIN, W.C.; LEVINE, M.M. (1992) Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemmagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.** 60, 2297-2304.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11, 142-201.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M.M. (1987) Patterns of Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells. **Pediatr. Infect. Dis.** 6, 829-831.

NATARO, J.P.; STEINER, T.; GUERRANT, R.L. (1998) Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.** 4: 829-831.

NATARO, J.P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D. WALKER, K. (1994) AggR, a Transcriptional Activator of Aggregative Adherence Fimbria I Expression in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 176, 4691-4699.

NAUMOVSKI, L.; QUINN, J.P.; MIYASHIRO, D.; PATEL, M.; BUSH, K.; SINGER, S.; GRAVES, D.; PALZKILL, T.; ARVIN, A.M. (1992) Outbreak of ceftazidime resistance due to novel extended-spectrum β -lactamase in isolates from cancer patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 36, 1991-1996.

PABST, W.L.; ALTWEGG, M.; KUND, C.; MIRJANIC, S.; HARDEGGER, D.; NADAL, D. (2003) Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* Among Children with and without Diarrhea in Switzerland. **J. Clin. Microbiol.** 41, 2289-2293.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. (2005) Extended-Spectrum β -lactamases : a clinical Update. **Clin. Microbiol. Rev.**, 18, 657-686.

PAUL, M.; TSUKAMOTO, T.; GHOSH, A.R.; BHATTACHARYA, S.K.; MANNA, B.; CHAKRABARTI, S. NAIR, G.B.; SACK, D.A.; SEN, D.; TAKEDA, Y. (1994) The Significance of Enteroaggregative *Escherichia coli* in the Etiology of Hospitalized Diarrhoea in Calcutta, India and Demonstration of a New Honey-Combed Pattern of Aggregative Adherence. **FEMS Microbiol. Lett.** 117, 319-326.

POREL, L.; LEBESSI, E.; CASTRO, M.; FEVRE, C.; FOUSTOUKOU, M.; NORDMANN, P. (2004) Nosocomial outbreak of extend-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48, 2277-2279

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

RASMUSSEN, M., CASEY, T. (2001) Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. **Crit. Rev. Microbiol.** 27, 57-73.

ROSA, A.C.P.; MARIANO, A.T.; PEREIRA, A.M.S.; TIBANA, A.; GOMES, T.A.T.; ANDRADE, J.R.C. (1998) Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol.** 47, 781-790.

SANDERS, C.C.; SANDERS, W.E. JR. (1992) β -lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.**, 15, 824-839.

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

SCALETSKY, I.C.A.; FABBRICOTTI, S.H.; SILVA, S.O.G.; MARAIS, M.B.; FAGUNDES-NIETO, U. (2002) HEp-2 Adherence *Escherichia coli* Strains Associated with Acute Infantile Diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** 8, 855-858.

SCHMIDT, H; KNOP, C; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. (1995) Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 33, 701-705.

SCHORLING, J.; MCAULIFFE, J.; SOUZA, M.D.; GUERRANT, R.L. (1990) Malnutrition is associated with increased diarrhea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. **Int. J. Epidemiol.** 19, 728-35.

SCHULTSZ, C.; VAN DEN ENDE, J.; COBELENS, F.; VERVOORT, T.; VAN GOMPEL, A.; WETSTEYN, J.C.; DANKERT, J. (2000) Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. **J. Clin. Microbiol.** 38, 3550-3554.

SHAH, A.A; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. (2004) Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. **Res. Microbiol.**, 155, 409-421.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL'AGNOL, M.; PHILLIPS, A.D.; NATARO, J.P. (2002) Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 41, 983-997

SMITH, H.R.; SCOTLAND S.M.; WILLSHAW, G.A.; ROWE, B; CRAVIOTO, A; ESLAVA, C. (1994) Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of Diverse Origin are Enteroaggregative. **J. Infect. Dis.** 170, 1610-1613.

SMITH, H.R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. (1997) Enteroaggregative *Escherichia coli* and Outbreaks of Gastroenteritis in UK. **Lancet.** 350, 814-815.

SOBIESZCZANSKA, B.M; OSEC, J.; WASKO-CZOPNIK, D.; DWORNICZEK, E.; JERMAKOW, K. (2007) Association of enteroaggregative *Escherichia coli* with irritable bowel syndrome. **Clin. Microbiol. Infect.** 13, 404-407.

SOUZA, M.A. JR; FERREIRA, E.S.; CONCEIÇÃO, G.C. (2004) Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, 63, 152-174.

STEINER, T.S.; LIMA, A.A.M.; NATARO, J.P.; GUERRANT, R.L. (1998) Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.** 177, 88-96.

SUNDSTROM, L. (1998) The potential of integrons and connected horizontal programmed rearrangements for mediating gene transfer. **APIMIS** 84, 37-42.

SWERDLOW D.L., WOODRUFF B.A., BRADY R.C., GRIFFIN P.M., TIPPEN S., DONNELL H.D JR., GELDREICH E., PAYNE B.J, MEYER A. JR., WELLS J.G, ET AL. (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Intern. Med.** 117:812-9.

TOLEDO, M.R.F., ALVARIZA, M.C.B.; MURAHOVSKI, J.; RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, L.R. (1983) Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infect. Immun.** 39, 586-589.

UBER, A.P; TRABULSI, L.R.; IRINO, K; BEUTIN, L.; GHILARDI, A.C.R.; GOMES, T.A.T.; LIBERATORE, A.M.A.; CASTRO, A.F.P.; ELIAS, W.P. (2006) Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiol. Lett.** 256, 251-257.

VILLASECA, J.M.; HERNÁNDEZ, U.; SAINZ-ESPUÑES, T.R.; ROSÁRIO, C.; ESLAVA, C. (2005) Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. **Rev. Latinoam. Microbiol.** 47 (3-4), 140-159.

WAKIMOTO, N.; NISHI, J.; SHEIKH, J.; NATARO, J.P.; SARANTUYA, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; KAWANO, Y. (2004) Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 71, 687-690.

WANKE, C.A; SCHORLING, J.B.; BARRETT, L.J.; DESOUZA, M.A.; GUERRANT, R.L. (1991) Potential Role of Adherence Traits of *Escherichia coli* in Persistent Diarrhea in a Urban Brazillian Slum. **Pediatr. Infect. Dis.** 10, 746-751.

WEINTRAUB, A. (2007) Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J. Med. Microbiol.** 56, 4-8.

WILLIAMS, J.D. (1997) β -lactamase inhibition and in vitro activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone. **Clin. Infect. Dis.**, 24, 494-497.

WINOKUR, P.L.; CANTON, R; CASELLAS, J.M.; LEGAKIS, N. (2001) Variações na prevalência de cepas que expressam um fenótipo da β -lactamase de espectro estendido e caracterização de isolados provenientes da Europa, das Américas e da região do Pacífico Oeste. **Clin. Infec. Dis.**, 32, supl.2, 94-103.

WITTE, W. (2004) International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. **Infect. Genet. Evol.**, 4, 187-191.

Study of virulence factors and ESBL in Enteroaggregative Escherichia coli strains isolated from human consume water.

Karen de Castro Bauab, Silvia Emanuelle Cestari, André Van Helvoort Lengert, Jacinta Sanchez Pelayo

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Campus Universitário, Cx. Postal 6001, 86051-990 Londrina, PR, Brazil.

*Correspondence author - email: karenbauab@yahoo.com.br

ABSTRACT

Diarrhea is one of the main causes of the mortality in developed and under development countries. High percentage is caused for diarrheogenic *E. coli*. EAEC is an emerging bacterial pathogen with are causative agents of diarrhea between children and HIV positive patients and is know for show a stacked-brick configuration in epithelial cells. The main of this work was to study the prevalence, virulence factors and ESBL production in EAEC strains isolated from water samples to consume. These samples were collected from 27 Paraná north cities, from Brazil. It was isolated 279 strains of *E. coli* and, of these, 152 (54.48%) strains show AA pattern in the assay with HEP-2 cells. These strains were tested to virulence genes presence: *aatA*, *aap*, *aggR*, *astA* e *hlyA* and, phenotypically, to enterohemolysin production, polystyrene adherence and ESBL production. The 152 EAEC strains were negative for genes *aap*, *aatA* e *aggR*, therefore, were classified as atypical EAEC. Three strains (1.91%) had the *astA* gene and 9 (5.92%) strains had the *hlyA* gene. Sixty four (42.1%) strains were positives in sorting test to ESBL presence, of which, 29 strains were confirmed through combined disk. Our results suggest that other virulence factors can be involved in AA standard show for studied strains. The ESBL presence in 19% for EAEC strains isolated from human consume water represents a problem to intestinal infections development for multi-drug resistant EAEC and for resistance genes spread in environment.

Key Words: EAEC; consume water; virulence factors; ESBL.

INTRODUCTION

Bacterial diarrhea is the most common cause of mortality in children from developing countries (7, 31).

Diarrheogenic *Escherichia coli* have an important role in infant diarrhea etiology (21, 37, 47) and were classified as enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) e diffusely adherent *E. coli* (DAEC).

Though this classification remains used to most authors becomes evident that some categories include very different microorganisms. So, EPEC e EAEC were subdivided in typical and atypical, and the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) began to be a STEC subcategory (26).

EAEC was called for Nataro et al., in 1987, to characterize that *E. coli* strains with standard adhesion in HEp-2 cells called aggregative adherence (AA) and it is an emerging diarrheogenic pathogen (33, 34, 35, 51, 55) associate to persistent diarrhea (5, 11, 18, 27, 54) and acute diarrhea (9, 22, 24, 39, 43, 44).

EAEC also have been isolated from faeces of patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (15, 20, 25, 55) and from faeces of adults travelers (1, 19, 41).

Many virulence factors of EAEC are localized in a plasmid of 60 to 65 MDa called AA plasmid, including fimbrial adhesins I, II e III (4, 12, 29); enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin (EAST1) (39); the plasmid-encoded toxin (Pet) (16); a protein involved in EAEC anti-aggregation (dispersin) (42) and the AggR gene, that is a transcriptional activator belonging to AraC family (30).

Experiments with human intestine strains show that EAEC adhere in the intestinal mucosa stimulating mucus secretion and form a thick biofilm (23, 28, 30).

In 2004, Nataro suggested call EAEC typical for stains that have AggR regulator. Dudley et al., (2006) show that the transcriptional activator AggR controls the plasmid AA gene and also some chromosomal genes.

Uber et al. (2006) held a study with EAEC strains isolated from human and animals (calves, pigs and horses) comparing them with virulence factors gene presence. Any isolated strain from animals that show AA pattern hybridized with *aggR* regulator gene, been considered atypical EAEC and 63% of strains isolated from human faeces show *aggR* gene and were considered typical EAEC.

In accordance with the works made for Itoh et al. (1997) and Adashi et al, (2002), one of the main human infections sources for EAEC is associate with water and contaminated food ingestion.

ESBL have been isolated with high frequency in strains from hospitalized patients, but, also can be found in strains from community origin. The digestive tube acts as potential reservoir to that multi-drug resistant microorganisms and offers suitable habitat to transmit resistance to others bacterial strains (45).

The aim of this study was research the prevalence of EAEC strains in human consume waters from 27 cities of Paraná, Brazil, the virulence factors and detects the ESBL presence.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial Strains

Were studied 279 *E. coli* strains isolated from water samples collected from 27 cities of Paraná State north, Brazil between February of 2005 and January of 2006. The coliforms and *E. coli* detection were realized using the Colilert (Quanti-Tray/2002TM) kit (IDEXX Laboratories, represented by SOVEREIGN - BR). Also, were made *E. coli* isolation in MacConkey plates (Biobras, MG, Brazil) and biochemistry identification using the following

tests: EPM (48), MILi (49) and Simon's citrate (Biobras, MG, Brazil). The strains were stored in brain heart infusion broth (BHI) (Difco, Michigan, USA) with 20% glycerin at -70°C until use. Only *E. coli* strains that show AA pattern in HEp-2 cells were object of study, and then, submitted to other tests. Bacterial strains used as positive controls in the present study are listed in the Table 1. The strain HB101 (*E. coli* K-12) (06) was used as negative control in all realized tests.

HEp-2 cell adherence assay

All 279 *E. coli* isolates were tested for adherence to HEp-2 cells as described previously (10). When the adherence pattern was not defined after 3h incubation, the test was repeated using a 6h incubation period.

Adherence capacity in polystyrene microplate

Adhesion to an inert surface was assayed employing the method described by Stepanovic et al. (46). Bacterial isolates were grown overnight at 37°C in TSB (Tryptic Soy Broth) supplemented with 1% glucose (TSBG) (Difco, Detroit, Michigan, USA). The cultures were diluted 1:100 in TSBG, and 200µL of this suspension were added to sterile 96-well polystyrene plates (NUNC, USA), and incubated for 24 hours at 37°C. TSBG alone was used as the negative control. After this period, the content of each well was aspirated, and the wells were washed three times with 250µL of sterile saline. The attached bacteria were fixed with 200µL of 99% methanol (Merck, Frankfurter, Darmstadt, Germany) per well, and after 15 minutes, the plates were emptied and allowed to dry. The plates were stained for 5 minutes with 200µL of 2% Hucker crystal violet per well. Excess stain was rinsed off by placing the plate under running tap water. The plates were air-dried, and the optical density (OD) of each well was measured at 550nm with a Micro-ELISA Autoreader (MultiScan EX, Labsystem,

Uniscience, Finland). All the assays were performed in triplicate, and the mean OD (OD_a) was used to determine the degree of adherence. This value was compared with the OD of TSBG after the same procedure. To determine the degree of adherence, the following classification was used: non-adherent ($OD_a \leq OD$), weakly adherent ($OD < OD_a \leq 2 \times OD$), moderately adherent ($2 \times OD < OD_a \leq 4 \times OD$) and strongly adherent ($4 \times OD < OD_a$).

Detection of Virulence genes by PCR

The 152 EAEC strains were screened for the presence of sequences of *hlyA* (37), *astA* (53), *aatA* (41), *aapA* e *aggR* (13). Luria-Bertani agar (LB) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) cultures were suspended in 300 μ L Milli-Q water (Millipore) and boiled for 10 minutes to release and denature the bacterial DNA. Amplification of bacterial DNA was carried out in a volume of 25 μ L, containing 10 μ L bacterial lysate, 200 μ M dNTP, 1.5mM $MgCl_2$, 20pmol of each primer and 1.5U *Taq* DNA polymerase (all from Gibco-BRL). PCR involved 50 cycles of 30 seconds at 94°C for denaturation of DNA, followed by 30 seconds at 60°C for annealing of the primers and 30 seconds at 72°C for extension of DNA. An initial DNA denaturation step at 94°C for 5 minutes and final extension of DNA at 72°C for 7 minutes were performed. The PCR product was submitted to 1.0% agarose gel electrophoresis (Difco, Detroit, Michigan, USA), stained with ethidium bromide (Gibco-BRL) and visualized using UV light.

Detection of Hemolysin Production

The 152 EAEC strains were tested for hemolysin production as described previously (03). The strains were cultivated on blood agar (Difco, Michigan, USA), supplemented with 10mM CaCl₂ and 5 % defibrinated sheep erythrocytes that were washed three times in PBS (phosphate buffered saline) pH 7.2. Plates were examined for hemolysis zones around bacterial growth after 3h (alpha-hemolysin) and 24h (enterohemolysin) incubation at 37° C.

ESBL Detection

For screening of ESBL producer strains were made the sensibility test for antimicrobial drugs for the disk-diffusion method, described by Bauer et al. (1966). The procedure followed the standards described in “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) manual of 2007. The β -lactam used and de inhibition zones considered positives to screening test were: aztreonam (30 μ g) (Oxoid) \leq 27mm; cefotaxime (30 μ g) (Oxoid) \leq 27mm; ceftazidime (30 μ g) (Oxoid) \leq 22mm e ceftriaxone (30 μ g) (Oxoid) \leq 25mm. The strains was considered possibility ESBL producer, when show the positive inhibition zone to any four antibiotics tested.

To phenotypic confirmation to ESBL production was used the combined disk test, recommended for CLSI (2007).

It was used cefotaxime disk (30 μ g) and ceftazidime disk (30 μ g) with or without clavulanic acid (10 μ g) (Oxoid).

The test was considered positive when there is increase \geq 5mm in diameter of halo to any two antibiotic agents tested in combination with clavulanic acid compared with only antibiotic tested.

RESULTS

Determinação do padrão de adesão em células

Two hundred seventy nine *E. coli* strains were isolated from water and submitted to HEp-2 adhesion assay. One hundred fifty two (54.48%) show AA pattern where chain-like adhesion; 16 predominant AA to coverslip and 134 typical AA (in coverslip and cell).

Adherence capacity in polystyrene microplate

Of the 156 EAEC strains tested 125 (82.78%) were found to be weakly adherent, 14 (9.27%) non-adherent, 5 (3.31%) moderately adherent and 5 (3.31%) strongly adherent.

Detection of Virulence genes by PCR

Only 9 EAEC strains (5.92%) were positive for *hlyA* gene and 3 strains (1.97%) showed *astA*. All strains were negative for genes presence: *aggR*, *aatA* and *aap*.

Detection of Hemolysin Production

All EAEC strains were submitted from phenotypic detection of hemolysin production. Only 9 strains positive for *hlyA* gene produced enterohemolysins in blood agar plates.

ESBL Detection

The 152 EAEC strains were submitted to sensibility test of antimicrobial drugs by the disk-diffusion method for screening of ESBL production and subsequent, submitted to disk-combined test for production of ESBL confirmation.

Twenty nine EAEC strains (19%) were confirmed as ESBL producer by disk-combined test.

DISCUSSION

EAEC was the most of *E. coli* strains isolated from human consume water in our study.

Until the moment, it wasn't meeting in the literature dates under EAEC prevalence in human consume water. Falcão et al., in 2004, studied same of ice and show that 24% of *E. coli* strains were AA standard and were classified as EAEC. No strain was classified in other *E. coli* diarrheogenic category. It is according with our results of this study.

All strains were negative to *aggR*, *aatA* and *aap* genes presence. However, Czeczulin et al. (1999) show that two in three strains involved in diarrhea outbreaks in Serbia and Japan were negative probe EAEC.

AggR is the transcription activator of most virulence genes already described in EAEC (14). In present study, all strains were negative to *aggR*. Probably, other fimbrial adhesins don't regulated for *aggR*, yet don't described, are involved in aggregative adhesion show for strains studied, named, under Nataro (2004), atypical EAEC.

In one study of Uber et al. (2006), any strain isolated from animals show AA standard hybridized whit *aggR* gene. So, it was considered atypical EAEC. Based in this dates, its possible create the hypothesis that strain of this study can be from animal origin.

The adherence capacity in abiotic material is extremely important, because suggest the capacity of biofilm formation in wells, pipelines and water cups.

The biofilm formation possibility for bacterial isolated from water can't be discarded, because the most strains adhered to polystyrene. Mohamed et al. (2007) correlated the *aggR* gene presence in EAEC with greater degree of adherence in polystyrene microplates. This may explain the fact of most strains of this study be weakly adherent in the test.

In the search literature, haven't papers reporting the ESBL presence in bacterial strains isolated from consume water. Twenty nine strains of EAEC (19%) were confirmed as ESBL

producer. This result is many worrying because the digestive tube can act as potential reservoir of multi-drug resistant (46). Also have the possibility of development of intestinal infections for multi-drug resistant EAEC, mostly the infections that show as chronic and in immunocompromised patients.

The presence of this microorganism in water, that represents a powerful dissemination agent, can facilitate the transference of resistance genes to other bacterial.

REFERENCE

1. Adachi J.A., Jiang Z.D., Mathewson J.J., Verenkar M.P., Thompson S., Martinez-Sandoval F., Ericsson C.D., Dupont H.L. (2001) Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. Clin Infect Dis **32**: 1706-09.
2. Bauer A.W., Kirby W.M.M., Cherris J.C., Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol **45**: 493-96.
3. Beutin L., Prada J., Zimmermann S., Stephan R., Orskov I., Orskov F. (1988) Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Zentralbl Bakt Hyg **267**: 576-88.
4. Bernier C., Gounon P, Le Bouguéne C. (2002) Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III- encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. Infect Immun **70**: 4302-11.
5. Bhatnagar S., Bhan M.K., Sommerfelt H., Sazawal S., Kumar R., Saiani S. (1993) Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a New Pathogen Causing Acute and Persistent Diarrhea. Sacand J Infec Dis **25**: 579-83.
6. Boyer H.W. and Roulland-Dussoix D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J Mol Biol **14**: 459-72.
7. Clarke S. C. (2001) Diarrhoeagenic *Escherichia coli*: an emerging problem? Diag Microbiol Infect Dis **41**: 93-8
8. CLSI - Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 15^o Supplement Informative. Clin Lab Stand Inst/NCCLS. M100-S15 Vol. 25 No. 1.
9. Cobeljic M., Miljkovic-Selimovic B., Paunovic-Todosijevic D., Velickovic Z., Lepsanovic Z., Zec N., Savic D., Ilic R., Konstantinovic S., Jovanovic B., Kostic V. (1996) Enteroaggregative *Escherichia coli* Associated with na Outbreak of Diarrhoea in a Neonatal Nursery Ward. Epidemiol Infect **117**: 11-6.
10. Cravioto A., Gross R. J., Scotland S. M., Rowe B. (1979) An Adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol **3**: 95-9.

11. Cravioto A., Tello A., Navarro A., Ruiz J., Villafan H., Uribe F., Eslava C. (1991) Association of *Escherichia coli* HEp-2 Adherence Patterns with Type and Duration of Diarrhoea. *Lacent* **337**: 262-64.
12. Czczulin J.R., Balepur S, Hicks S., Phillips A., Hall R., Kothary M.H., Navarro-Garcia F., Nataro J.P. (1997) Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**: 4135-45.
13. Czczulin J.R., Whittam T.S., Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Nataro J.P. (1999) Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**: 2692-99.
14. Dudley E. G., Abe C., Ghigo J. M., Latour-Lambert P., Hormazabal J. C., Nataro J. P. (2006) An IncI1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infect Immun* **74**: 2102-14.
15. Durrer P., Zbinden R., Fleish F., Altwegg M., Landererber B., Karsh H., Weber R. (2000) Intestinal Infection due to Enteroaggregative *Escherichia coli* Among Human Immunodeficiency Virus-infected Persons. *J Infect Dis* **182**: 1540-544.
16. Eslava C., Navarro-Garcia F., Czczulin J.H., Henderson I.R., Cravioto A., Nataro J.P. (1998) Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**: 3155-163.
17. Falcão J.P., Falcão D.P., Gomes T.A.T. (2004) Ice as a vehicle for diarrheagenic *Escherichia coli*. *Intern J Food Microbiol* **91**: 99-103.
18. Fang G.D., Lima A.A.M., Mertins C.V., Nataro J.P., Guerrant R.L. (1995) Etiology and Epidemiology of Persistent Diarrhea in Northeastern Brazil: a Hospital-based Prospective, Case-control Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **21**: 137-44.
19. Gascón J., Vargas M., Quinto L., Corachan M., Jimenez de Anta M.T., Vila J. (1998) Enteroaggregatiive *Escherichia coli* Strains as a Cause of a Traveler's Diarrhea: a Case-control Study. *J Infect Dis* **177**: 1409-12.
20. Germani Y., Minssart P., Vohito M., Glaziou P., Hocquet D., Berthelemy P., Morvan J. (1998) Etiologies of Acute, Persistent and Dysenteric Diarrheas in Adults in Bangui, Central African Republic, in Relation to Human Immunodeficiency Virus Serostatus. *Am J Trop Med Hyg* **59**: 1008-14.

21. Gomes T.A.T., Blake P.A., Trabulsi L.R. (1989) Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J Clin Microbiol* **27**: 266-69.
22. Haider K., Faruque S.M., Sharid N.S., Albert M.J., Nahar S., Malek A, Tzipori S, Alam A.N. (1991) Enteroaggregative *Escherichia coli* Infections in Bangladeshi Children: Clinical and microbiological Features. *J Diarrhoeal Dis Res* **9**: 318-22.
23. Hicks S., Candy D.C., Phillips A.D. (1996) Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun* **64**: 4751-60.
24. Itoh Y., Nagano I., Kunishima M., Ezaki T. (1997) Laboratory Investigation of Enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable : H10 Associated with a Massive Outbreak of Gastrointestinal Illness. *J Clin Microbiol* **35**: 2546-50.
25. Kahali S., Sarkar B., Rajendran K., Khanam J., Yamasaki S., Nandy R.K., Brattacharya S.K., Ramamurthy T. (2004) Virulence Characteristics and Molecular Epidemiology of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates from Hospitalized Diarrheal Patients, in Kolkata, India. *J Clin Microbiol* **42**: 4111-20.
26. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *N Rev Microbiol* **2**: 123-38.
27. Lima A.A.M., Fang G., Schorling J.B., Albuquerque L., Mcauliffe J.F., Mota S., Leiter R., Guerrant R.L. (1992) Persistent Diarrhea in Northeast Brazil: Etiologies and Interactions with Malnutrition. *Acta Paediatr Suppl* **381**: 39-44.
28. Mohamed J.A, Huang D.B, Jiang Z., Dupont H.L., Nataro J.P, Belkind-Gerson J., Okhuysen P.C. (2007) Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J Clin Microbiol* **45**: 121-26
29. Nataro J.P, Deng Y., Maneval D.R., German A.L., Martin W.C., Levine M.M. (1992) Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemmagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* **60**: 2297-304.
30. Nataro J.P., Kaper J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.

31. Nataro J.P, Kaper J.B, Robins-Browne R., Prado V., Vial P., Levine M.M. (1987) Patterns of Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells. *Pediatr Infect Dis* **6**: 829-31.
32. Nataro J., Seriwatana J., Fasano A., Maneval D.R., Guers L.D., Noriega F., Dubovsky F., Levine M.M., Morris Jr. G. (1995) Identification and Cloning of a Novel Plasmid Encoded Enterotoxin of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* Strains. *Infect Immun* **63**: 4721-28.
33. Nataro J.P., Yikang D., Yingkang D., Walker K. (1994) AggR, a Transcriptional Activator of Aggregative Adherence Fimbria I Expression in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 4691-99.
34. Okeke I.N., Nataro J.P. (2001) Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis* **1**: 304-13.
35. Pabst W.L., Altwegg M., Kund C., Mirjanic S., Hardegger D., Nadal D. (2003) Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* Among Children with and without Diarrhea in Switzerland. *J Clin Microbiol* **41**: 2289-93.
36. Paton A.W., Paton J.C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol* **36**: 598-602
37. Rosa A.C.P., Mariano A.T., Pereira A.M.S., Tibana A., Gomes T.A.T., Andrade J.R.C. (1998) Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* **47**: 781-90.
38. Savarino S.J., Fasano A., Robertson D.C., Levine M.M. (1991) Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J Clin Invest* **87**: 1450-55.
39. Scaletsky I.C.A., Fabriccotti S.H., Silva S.O.G., Marais M.B., Fagundes-Nieto U. (2002) HEp-2 Adherence *Escherichia coli* Strains Associated with Acute Infantile Diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis* **8**: 855-58.
40. Schmidt H., Knop C., Franke S., Aleksic S., Heesemann J., Karch H. (1995) Development of PCR for screening oh enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **33**: 701-05.

41. Schultsz C., Van Den Ende J., Cobelens F., Vervoort T., Van Gompel A., Wetsteyn J.C., Dankert J. (2000) Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. *J Clin Microbiol* **38**: 3550-54.
42. Sheikh J., Hicks S., Dall'Agnol M., Phillips A.D., Nataro J.P. (2002) Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**: 983-97.
43. Smith H.R., Scotland S.M., Willshaw G.A., Rowe B, Cravioto A, Eslava C. (1994) Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of Diverse Origin are Enteroaggregative. *J Infect Dis* **170**: 1610-13.
44. Smith H.R., Cheasty T., Rowe B. (1997) Enteroaggregative *Escherichia coli* and Outbreaks of Gastroenteritis in UK. *Lancet* **350**: 814-15.
45. Souza Jr M.A., Ferreira E.S., Conceição G.C. (2004) Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *Newslab* **63**: 152-74.
46. Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M. (2000) A modified microtiter plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Meth* **40**: 175-79.
47. Toledo M.R.F., Alvariza M.C.B., Murahovschi J., Ramos S.R.T.S., Trabulsi L.R. (1983) Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect Immun* **39**: 586-89.
48. Toledo M.R.F., Fontes C.F., Trabulsi L.R. (1982_a) EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano-desaminase. *Rev Microbiol* **13**: 309-315.
49. Toledo M.R.F., Fontes C.F., Trabulsi L.R. (1982_b) MILi: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. *Rev Microbiol* **13**: 230-35.
50. Uber A.P, Trabulsi L.R., Irino K, Beutin L., Ghilardi A.C.R., Gomes T.A.T., Liberatore A.M.A., Castro A.F.P., Elias W.P. (2006) Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. *FEMS Microbiol Lett* **256**: 251-57.
51. Villaseca J.M., Hernández U., Sainz-Espuñes T.R., Rosário C., Eslava C. (2005) Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. *Rev Latinoam Microbiol* **47**: 140-59.

52. Yamamoto T., Echeverria P. (1996) Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun* **64**: 1441-45.
53. Yu J., Kaper J.B. (1992) Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **6**: 411-17.
54. Wanke C.A, Schorling J.B., Barrett L.J., Desouza M.A., Guerrant R.L. (1991) Potential Role of Adherence Traits of *Escherichia coli* in Persistent Diarrhea in a Urban Brazillian Slum. *Pediatr Infect Dis* **10**: 746-51.
55. Weintraub A. (2007) Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol* **56**: 4-8.

Table 1 - Bacterial strains used as positive controls in this study

Cepa	Sorotipo	Origem	Genes de Virulência	Referência
EDL933	O157:H7	Human	<i>hlyA</i>	Yu and Kaper (1992)
O42	O44:H18	Human	<i>astA, aggR, aat, aap</i>	Nataro <i>et al.</i> (1995)