



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JEANNE WEBER VENDRUSCOLO

**DESENVOLVIMENTO DE MULTIPLEX PCR PARA
DETECÇÃO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE FEZES E ÁGUA**

Londrina
2016

JEANNE WEBER VENDRUSCOLO

**DESENVOLVIMENTO DE MULTIPLEX PCR PARA
DETECÇÃO DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE FEZES E ÁGUA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *lato sensu* em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Vendruscolo, Jeanne Weber.

Desenvolvimento de multiplex PCR para detecção de *Escherichia coli* diarreogênicas isoladas de amostras de fezes e água / Jeanne Weber Vendruscolo. - Londrina, 2016. 38 f.

Orientador: Sérgio Paulo Dejato da Rocha.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2016.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* - Tese. 2. Genética bacteriana - Tese. 3. Enterobactérias - Tese. 4. Biologia Molecular - Tese. I. Rocha, Sérgio Paulo Dejato da. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

JEANNE WEBER VENDRUSCOLO

**DESENVOLVIMENTO DE MULTIPLEX PCR PARA DETECÇÃO DE
Escherichia coli DIARREIOGÊNICAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE
FEZES E ÁGUA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *lato sensu* em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da
Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 05 de setembro de 2016.

*Ao tempo, que nos contempla com a graça de
apreciar a beleza e a certeza de que ter fé em Deus torna
nossos dias mais agradáveis e promissores.*

AGRADECIMENTOS

Ao nosso Ser maior e mais admirável, Deus. Por Sua imponente, presteza e acolhimento. Sem Seu acolhimento e amor por nós, nada seria possível.

Aos meus admiráveis pais, por estarem sempre atentos e disponíveis às intempéries da vida, com amor e preocupação incomparáveis dispendidos aos filhos. O Jean e eu amamos muito vocês!

Ao meu amor, Eduardo Augusto, por seu senso crítico, disposição e carinho, não fraquejando e aceitando de forma sensata e sábia o nosso progresso com trajetórias não tão uniformes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio, por sua inteligência e persistência no fazer pesquisa em meio a um turbilhão de acontecimentos políticos e econômicos do nosso país, dificultando, muitas vezes, o desfecho de um projeto em curso.

À Profa. Dr. Jacinta, pelo empenho ao longo dos anos e conquistas no Laboratório de Bacteriologia.

Aos colegas de mestrado, pelo prazer da companhia e conhecimentos divididos.

Aos amigos do laboratório: Taynara, Paulo, Nicole, Gustavo, Luana, Tatiane, Angélica, Claci, Antônio, pelo prazer de dividir o dia a dia com vocês, tornando esse período tão agradável.

Aos amigos que colaboram com esse trabalho cedendo amostras, conhecimentos e tempo: Paulo, Tatiane, Angélica e Juan.

À UEL, pela oportunidade de uma educação de qualidade e gratuita.

À CAPES e à Fundação Araucária (PPSUS), pelo apoio financeiro.

A todos que abrilhantam os meus dias, muito obrigada! Cada degrau subido é graças às experiências vividas com vocês. Sucesso e amor sempre!

“ Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente.

Quem sobrevive é o mais disposto à mudança. ”

(Charles Darwin)

VENDRUSCOLO, Jeanne Weber. **Desenvolvimento de multiplex PCR para detecção de *Escherichia coli* diarreio gênicas isoladas de amostras de fezes e água.** 2016. 38 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

RESUMO

Considerada a segunda causa mundial de mortalidade infantil, a diarreia é uma manifestação clínica negligenciada, especialmente pelo seu diagnóstico microbiológico laborioso. A doença é causada por uma ampla variedade de patógenos, incluindo a categoria diarreio gênicas de *Escherichia coli* (DEC), que abrange os patótipos *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroativas (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC), diferenciando entre si pelos fatores de virulência, resultando em diferentes formas de agressão aos enterócitos. Com o intuito de desenvolver um novo sistema de multiplex PCR para identificação segura e adequada dos cinco principais patótipos de DEC, neste trabalho, foram desenvolvidos cinco pares de oligonucleotídeos iniciadores para os seguintes genes: *aaIC*, *escV*, *bfpA*, *ipaH* e *elt*, através de ferramentas de Bioinformática. Devido à dificuldade de padronização dos iniciadores para *stx1* e *stx2*, utilizamos estes iniciadores descritos na literatura. Para a validação do sistema, foram analisadas 413 amostras das coleções dos Laboratórios de Bacteriologia e Bacteriologia Básica e Aplicada da Universidade Estadual de Londrina. Os resultados de sensibilidade foram agrupados por patótipos (EAEC, ETEC, STEC, EPEC típica e atípica, EIEC), sendo que 92,7% das cepas de EPEC atípica se correlacionaram, assim como, 72,8% de STEC, 81,35% de EAEC, 100% de EPEC típica, EIEC e ETEC. Os produtos de PCR satisfizeram a preocupação em manter resolução adequada em gel de agarose, a fim de evitar equívocos na leitura dos resultados, com produtos variando entre 130 a 530pb, garantindo bons resultados na rotina laboratorial, com a garantia da identificação correta dos patótipos de DEC.

Palavras-chave: *Escherichia coli* diarreio gênicas. Multiplex PCR. Diagnóstico.

VENDRUSCOLO, Jeanne Weber. **Development of multiplex PCR to detection diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated by stool and water samples.** 2016. 38 p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

ABSTRACT

Considered the second worldwide cause of infant mortality, diarrhea is a neglected clinical manifestation, especially for its laborious microbiological diagnosis. The disease is caused by a wide variety of pathogens, including the category of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC), which covers the pathotypes enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC), differing from each other by virulence factors resulting in different forms of aggression of enterocytes. In order to develop a new multiplex PCR system for safe and proper identification of five main pathotypes of DEC, in this work, were developed five pairs of primers for the following genes: *aaIC*, *escV*, *bfpA*, *ipaH* and *elt*, through Bioinformatics tools. Because of the difficulty of standardization of primers *stx1* and *stx2*, we use these primers described in the literature. For the validation of the system were analyzed 413 strains of collections of Basic Bacteriology and Bacteriology Laboratory and Applied State University of Londrina. The sensitivity data were grouped by pathotypes (EAEC, ETEC, STEC, typical and atypical EPEC and EIEC), whereas 92,7% of atypical EPEC strains correlated, as well STEC 72,8%, 81,35 % EAEC, 100% typical EPEC, ETEC and EIEC. PCR products satisfy the concern to maintain proper resolution agarose gel in order to avoid mistakes in reading the results, with products ranging from 130 to 530pb, ensuring good results in laboratory routine, with the assurance of correct identification of pathotypes DEC.

Keywords: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Multiplex PCR. Diagnosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	10
2.2	PATÓTIPOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DIARREIOGÊNICAS	11
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC)	11
2.2.2	<i>Escherichia coli</i> Produtora de Toxina Shiga (STEC)	14
2.2.3	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC)	16
2.2.4	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora (EIEC)	18
2.2.5	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	19
2.3	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DEC	20
3	REFERÊNCIAS	22
4	TRABALHO CIENTÍFICO	28
4.1	New multiplex PCR to detection diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> strains isolated by stool and water samples	29
5	CONCLUSÃO	38

1 INTRODUÇÃO

A diarreia apresenta-se como a segunda causa de mortalidade infantil nos países de baixo e médio desenvolvimento, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos de idade, por envolver diversos fatores de risco, dentre eles, ambientais, nutricionais e socioeconômicos (DANTAS, 2004; GUIMARÃES et al., 2001; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003; OLIVEIRA; LATORRE, 2010).

Tais fatores relacionam-se ao precário fornecimento de água potável, deficiências na assistência à saúde e na educação sanitária. Os indicadores socioeconômicos, como renda familiar e instrução escolar das mães, são fatores básicos de comportamento em relação à saúde da criança (FISCHER WALKER et al., 2012; FRANÇA et al., 2001). Bühler e colaboradores (2014), apontaram que as regiões Norte e Nordeste do Brasil apresentaram, respectivamente, 5 e 4 vezes maior taxa de mortalidade por diarreia aguda em menores de um ano que a região Sul, devido, principalmente, aos maiores índices de extrema pobreza.

A morbimortalidade decorre, também, da desnutrição causada pela diarreia persistente e enteropatia, o que resulta em infecções entéricas crônicas e recorrentes que geralmente não são contadas nas estimativas dos episódios diarreicos (PETRI et al., 2008).

Além de englobar aspectos nutricionais e socioeconômicos, a diarreia é determinada por diferentes patógenos, com características, muitas vezes, distintas, podendo atingir a frequência de 10 episódios diarreicos em crianças/ano em países em desenvolvimento, enquanto que em países desenvolvidos, os episódios diarreicos ocorrem 1-2 vezes/ano por criança. As bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* diarreiogênicas, *Shigella* e *Salmonella*; vírus e enteroparasitas têm importância relevante na patogênese da diarreia (GOMEZ-DUARTE, 2014; LIMA et al., 2013; LOUREIRO et al., 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *ESCHERICHIA COLI*

Representante da família Enterobacteriaceae, *E. coli* é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à microbiota intestinal. Esta estreita relação com as fezes, faz com que *E. coli* seja a base para a pesquisa de contaminação fecal em alimentos e água (MOURA et al., 2012). É a espécie de bactéria anaeróbia facultativa mais abundante dentre os componentes da microbiota intestinal humana, estabelecendo-se logo nas primeiras horas de nascimento e residindo no cólon humano por toda a vida, em uma relação simbiótica, onde há benefícios mútuos por décadas, desde que haja um quadro saudável do hospedeiro (FOUHY et al., 2012; WINDIFIELD; GROISMAN, 2003).

Após adquirirem diferentes fatores de virulência, ao longo da evolução, alguns clones de *E. coli* adaptaram-se a novos nichos e se tornaram capazes de causar um amplo espectro de doenças (CLEMENTS et al., 2012). As cepas de *E. coli* são sorologicamente divididas em sorogrupos ou sorotipos com base na sua composição antigênica (BANDO et al., 2009; CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

A patogênese microbiana é um mecanismo multifatorial e os patógenos possuem estratégias bioquímicas que, individualmente ou em conjunto, produzem infecções e/ou doenças. Para o estabelecimento da infecção, a adesão é essencial, pois permite ao patógeno ligar-se às células do hospedeiro, funcionando como um ponto de apoio para futuras interações, podendo resultar em doença (PETRI et al., 2008). Os mecanismos, como modificação da superfície da célula hospedeira, invasinas, toxinas e sistemas de secreção que transportam toxinas e outros fatores de virulência para o interior da célula hospedeira, são, também, fundamentais para o sucesso da infecção (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002; VILA ESTAPÉ; ZBOROMYRSKA, 2012).

Os patótipos de *E. coli* podem causar patologias como diarreias, infecções do trato urinário, meningites e sepse (CLEMENTS et al., 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). As cepas de *E. coli* responsáveis pelos quadros diarreicos são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e os sintomas dessas infecções

variam de diarreia aquosa autolimitada a complicações potencialmente fatais (ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011).

As cepas de DEC são classificadas em oito categorias ou patótipos de acordo com características específicas baseadas em seus mecanismos de patogenicidade, padrões distintos de adesão em células epiteliais cultivadas ou síndromes clínicas que causam: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que é classificada como um subpatótipo de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC), *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) e *E. coli* invasiva aderente (AIEC), sendo as duas últimas recentemente emergentes. Tem-se ainda, que os patótipos EPEC e EAEC são subdivididos em cepas típicas e atípicas (CLEMENTS et al., 2012; NATARO; KAPER, 1998, RAJENDRAM et al., 2010). Entretanto, os patótipos mais relevantes epidemiologicamente, relacionados aos casos de diarreia compreendem: EPEC, STEC/EHEC, ETEC, EIEC e EAEC, descritos a seguir.

2.2 PATÓTIPOS DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREIOGÊNICAS (DEC)

2.2.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

E. coli enteropatogênica (EPEC) tem sido caracterizada como uma importante causa de diarreia aguda na infância em países em desenvolvimento, como o Brasil, mostrando-se mais patogênica que outros patógenos diarreiogênicos, por provocar diarreia prolongada em crianças menores de 1 ano e prevalência de óbitos superior a 30% (CLARKE, 2001; SILVA; DA SILVA, 2005).

Subdivide-se em duas subcategorias, típica e atípica, sendo identificadas por marcadores de virulência específicos (GOMEZ-DUARTE, 2014; NATARO; KAPER, 1998). Compreendem cepas que não produzem toxina Shiga, tendo suas diferenças relacionadas aos sorotipos e à presença do plasmídeo *Escherichia coli* enteropatogenic adherence fator (EAF), que ocorre somente em EPEC típica (IIDA et al., 2010).

Ao longo dos anos, a prevalência mundial de EPEC típica reduziu drasticamente, desde os países industrializados aos em desenvolvimento, não se

sabendo exatamente a causa (HERNANDES et al., 2009; TRABULSI; KELLER; TARDELLI GOMES, 2002), emergindo, assim, surtos diarreicos por EPEC atípica (BANDO et al., 2009). Bueris e colaboradores (2007) ao analisarem 1.020 amostras diarreicas infantis na cidade de Salvador, Bahia, obtiveram apenas 1 resultado positivo para EPEC típica, enquanto que para EPEC atípica, os resultados positivos alcançaram 10%.

Segundo Puño-Sarmiento e colaboradores (2013), ao analisarem fezes de cães e gatos com diarreia obtiveram positividade de 18,8% para EPEC atípica, corroborando seu importante papel como agentes causadores de diarreia em animais jovens (menores de 4 meses).

Ambas as classes (EPEC típica e atípica) têm a habilidade de causar em células intestinais uma histopatologia conhecida como lesão A/E (*attaching and effacing*), caracterizada pela adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal, com destruição das microvilosidades, formação de pedestal e agregação de actina polarizada e outros elementos do citoesqueleto em locais de fixação bacteriana. Os genes responsáveis por essa lesão estão localizados em uma região cromossômica específica de 35,5Kb, denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) (MCDANIEL et al., 1995; ROCHA et al., 2011; TRABULSI; KELLER; TARDELLI GOMES, 2002).

Dentre os patógenos que causam lesão A/E, a presença da região LEE é uma característica comum. Sua relevância neste processo é observada em estudos, onde a introdução dessa região em uma cepa não virulenta (K-12 de *E. coli*), transforma-a em virulenta e capaz de desenvolver lesão A/E (MCDANIEL; KAPER, 1997). LEE apresenta cinco operons que compreendem três domínios funcionais com produtos distintos, tendo na região média (operon LEE5), a codificação de proteínas envolvidas com a aderência íntima, através do gene *eae* (*E. coli attaching and effacing*), que codifica para intimina (DONNENBERG; KAPER; FINLAY, 1997; JERSE; KAPER, 1991) e o gene *tir* que codifica para o receptor da intimina, Tir (Translocated intimin receptor), o qual é translocado para a superfície da célula hospedeira. Essa interação possibilita a ancoragem da EPEC na superfície da célula hospedeira, iniciando os processos de sinalização celular e reorganização dos componentes do citoesqueleto para formar o pedestal, que é efetivo na adesão

íntima de EPEC à superfície (KENNY et al., 1997; PELAYO et al., 1999; ROCHA et al., 2011; SILVA; DA SILVA, 2005).

Outros genes desta ilha de patogenicidade incluem genes que codificam um sistema de secreção tipo III (TTSS) (LEE1 a LEE3) e genes que codificam proteínas secretadas (LEE4), conhecidas como *E. coli secreted proteins* (Esp) (CLEARY et al., 2004).

Na região LEE3 encontra-se parte dos genes responsáveis pela estrutura do TTSS, sendo um dos genes envolvidos neste contexto o *escV* (*E. coli secretion*), essencial para a formação do pedestal de actina, não sofrendo influência por mutações em genes próximos a ele, como *escC* e *escN*, revelando-se um marcador confiável na análise genotípica (GAUTHIER; PUENTE; FINLAY, 2003).

Como dito anteriormente, apenas em cepas de EPEC típica está presente o plasmídeo EAF contendo os genes envolvidos com a biogênese de uma adesina fimbrial do tipo IV, denominada *Bundle Forming Pillus* (BFP), que é responsável pela interação interbacteriana e adesão localizada (AL) de EPEC à célula hospedeira, levando à formação de microcolônias (TRABULSI; KELLER; TARDELLI GOMES, 2002). Este, ainda, contém uma região que codifica o regulador dos genes de virulência de EPEC, chamado *Plasmid encoded regulator* (Per), o qual consiste em três genes: *perA*, *perB* e *perC*, que codificam proteínas que regulam a expressão do operon *bfp* e vários genes da região LEE (MELLIES et al., 1999).

2.2.2 *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga (STEC)

As cepas de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) constituem um importante grupo emergente de contaminantes de alimentos. As cepas de STEC encontram-se nas fezes de vários animais domésticos, como cães e gatos, e animais de maior porte, como cavalo e ruminantes, sendo o gado jovem, o principal veículo de contaminação (CLARKE, 2001; TRABULSI; KELLER; TARDELLI GOMES, 2002). Em estudo epidemiológico com animais na Espanha, Blanco e colaboradores (2004), estabeleceram os sorotipos e fatores de virulência de 514 isolados de STEC de amostras fecais de gado saudável e com diarreia. Destes, 20% apresentaram o gene *stx1*, 54% *stx2* e 26% *stx1* e *stx2*, o que reforça a necessidade de investigação epidemiológica em animais.

Os alimentos sujeitos à contaminação fecal também podem se tornar potencialmente perigosos, como frutas e vegetais, passíveis de irrigação com água contaminada ou adubo de fezes de animais. Nos últimos anos vem aumentando o envolvimento de outros veículos de transmissão, entre eles água de recreação e de rede pública (CLARKE, 2001; RUMI et al., 2012; TRABULSI; KELLER; TARDELLI GOMES, 2002) e águas de estações de tratamento de água (ETAs), como apontado por Schuroff e colaboradores (2014), em um levantamento em duas ETAs na cidade de Londrina, entre os anos de 2011 e 2012, encontrando em 171 isolados de *E. coli*, 4,7% de cepas positivas para os marcadores moleculares de STEC.

STEC tem como nomenclatura correspondente e intercambiável, a designação *E. coli* produtora de verotoxina (VTEC), por seus efeitos citotóxicos irreversíveis em células Vero (células de rim de macaco verde africano). Adota-se como subdivisão, o termo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) para as cepas que, além de produzirem a toxina Shiga, induzem a lesão A/E, descrita no patótipo anterior (EPEC), havendo, assim, agravamento dos sintomas clínicos nos indivíduos afetados (HUNT, 2010; PATON; PATON, 1998).

As infecções humanas por EHEC estão associadas à uma variedade de síndromes clínicas, incluindo diarreia com sangue, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU, cuja possível manifestação clínica mais grave é a falência renal aguda), anemia hemolítica e púrpura trombocitopênica, o que pode não ocorrer na maioria das infecções por STEC (CLARKE, 2001; MÜLLER; EHLERS; GRABOW,

2001). Em 2009, na Geórgia, em um surto de diarreia sanguinolenta, dos 87 pacientes com essa manifestação, 25 desenvolveram SHU, resultando em 7 mortes (28%). Tal manifestação clínica pode ocorrer entre 5 a 7 dias após o início da diarreia sanguinolenta, podendo, até mesmo, ter seu início após o fim dos sintomas diarreicos. No levantamento epidemiológico, verificou-se que dos pacientes com SHU, 3 moravam próximos uns dos outros (menos de 100 metros), com relato de 3 cães com sintomas gastrointestinais severos que faleceram próximo ao aparecimento dos primeiros sintomas de SHU nos pacientes abordados (CHOKOSHVILI et al., 2014).

Dentre os isolados de EHEC, aqueles pertencentes ao sorogrupo O157 são os mais importantes em termos de episódios de doença humana. O principal componente de virulência é a produção de uma ou mais toxinas Shiga, embora a sua ação isolada não seja suficiente para desenvolver a colite hemorrágica e SHU, sendo necessários fatores como presença do plasmídeo pO157, que codifica a enterohemolisina e a produção de adesinas fimbriais e afimbriais. Além do sorogrupo O157, sorotipos de STEC não-O157 também provocam doenças em humanos, predominando em diferentes países, como nos Estados Unidos (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007; HUNT, 2010). Dados apontam que na Argentina, a prevalência de SHU ultrapassa a marca de 450 casos ao ano, sendo que em 60% dos casos e são devidos à cepa O157:H7 (RUMI et al., 2012).

Divididas em dois grupos antigênicos, as toxinas Shiga 1 e 2 (Stx1 e Stx2) são codificadas por um gene cromossomal que pode ser facilmente transferido para linhagens de *E. coli* por intermédio de bacteriófagos, que se integram ao cromossomo da célula hospedeira, sendo facilmente disseminados entre diferentes cepas e podendo coexistir em uma mesma bactéria; assim, expressando um ou mais genes *stx* simultaneamente (PATON; PATON, 1998).

Stx1 é considerada altamente conservada, tendo suas variantes poucas diferenças nas sequências genéticas, sem grandes consequências nas suas propriedades antigênicas e citotóxicas. Stx2 é bastante heterogênea, com 26 variantes distintas descritas (BÜRK et al., 2003; HUNT, 2010; PATON; PATON, 1998). Essa diferenciação se faz necessária, visto que dados epidemiológicos apontam maior frequência de casos de SHU por cepas produtoras de Stx2, que as que produzem apenas Stx1 (EKLUND; LEINO; SIITONEN, 2002).

De acordo com Nataro e Kaper (1998), a dose infecciosa é bastante baixa, menos de 100 microrganismos são suficientes para causar a doença, conforme relatado nas investigações em episódios de surtos.

2.2.3 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

Dentre as categorias de DEC, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) tem grande importância por causar enfermidades infecciosas agudas ou subagudas de apresentação clínica polimorfa, afetando principalmente bovinos e suínos jovens. Além disso, as cepas de ETEC acometem crianças, principalmente as menores de dois anos de idade, além de serem responsáveis pela diarreia do viajante (QADRI et al., 2005; RODAS et al., 2011). Estudos epidemiológicos, realizados em diferentes cidades brasileiras, apontam que a incidência de ETEC, como único agente causal de diarreia, é baixa, cerca de 2,5% a 3,5% (REGUA-MANGIA et al., 2004; SOUZA et al., 2002). Contudo, um estudo realizado entre 2009 e 2010 em Cartagena, Colômbia, aponta que das 698 amostras fecais diarreicas e casos controle analisadas, de crianças de até 5 anos de idade, 17% apresentaram genes de virulência para ETEC (GOMEZ-DUARTE et al., 2013).

A patogenicidade das ETEC se dá pela combinação de dois fatores de virulência: a expressão de fatores de colonização (FC) específicos, podendo ser expressos um ou mais, sendo conhecidos 22 FCs, os quais permitem à bactéria colonizar o epitélio intestinal; e a habilidade de sintetizar enterotoxinas (NADA et al., 2010).

As enterotoxinas sintetizadas por ETEC dividem-se em 2 grupos, o grupo das enterotoxinas termoestáveis (ST) do tipo I e II e o grupo das enterotoxinas termolábeis (LT) do tipo I e II, todas codificadas por genes plasmidiais (QUADRI et al., 2005).

As enterotoxinas termoestáveis do tipo I e II são proteínas de baixo peso molecular, estáveis a 100°C por 30 minutos e pouco imunogênicas. ST-I é uma exotoxina, resistente à temperatura e à hidrólise enzimática, possuindo duas variantes genéticas, a STp (suínos) e STh (humanos), com grande homologia entre si (HIRST et al., 1984).

ST-II induz danos histológicos no epitélio intestinal, ocasionando perda celular das vilosidades, alterando o equilíbrio hidrossalino da mucosa do intestino delgado. Algumas amostras ETEC de origem suína sintetizam a ST-II, sendo raramente sintetizada por amostras de origem humana (NATARO; KAPER, 1998).

O grupo das enterotoxinas termolábeis do tipo I e II é constituído por proteínas de alto peso molecular, inativadas a 60°C por 15 minutos e imunogênicas. Nesta classe, encontram-se as LTh (humano) e LTp (suíno) que diferem em apenas um resíduo de aminoácido (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

LT-I tem uma relação físico-química, biológica e estrutural com a toxina colérica, porém com uma infecção mais branda e mais curta do que a causada pelo *Vibrio cholerae*, sendo neutralizada pelo antissoro antitoxina colérica, tendo a LT-II características semelhantes (CROXEN; FINLAY, 2010; VILA ESTAPÉ; ZBOROMYRSKA, 2012).

Para Rodas e colaboradores (2011), cepas LT são mais frequentes na América do Sul, quando comparadas às ST, sendo comprovado em seu trabalho realizado entre 2002 e 2006, na Bolívia, onde obteve-se 70% de positividade para LT, 23% para ST/LT e 7% para ST, em espécimes fecais diarreicos de 79 pacientes, tendo 43 isolados positivos para ETEC.

2.2.4 *Escherichia coli* Enteroinvasora (EIEC)

Com características bioquímicas e genéticas semelhantes às das espécies de *Shigella*, as cepas de *E. coli* enteroinvasora (EIEC) diferem dos outros patótipos de *E. coli* por não descarboxilarem lisina, serem imóveis e apresentarem o gene plasmidial *ipaH*, que expressa o antígeno de invasão (SETHABUTR et al., 2000; VAN DEN BELD; REUBSAET, 2012; VENKATESAN; BUYSSE; KOPECKO, 1989).

A manifestação clínica induzida pelos dois patógenos, denominada disenteria bacilar, caracteriza-se pela invasão e destruição da mucosa intestinal, com intensa reação inflamatória devido à ativação de células epiteliais intestinais e, ainda, à ativação e morte de células fagocíticas. Ambos mecanismos levam à produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, as quais são mediadoras de lesão tissular (PHALIPON; SANSONETTI, 2007).

Embora não seja indicador do fenótipo invasivo, *ipaH* mostra-se um gene específico e bem conservado para cepas de EIEC e *Shigella*, sendo expresso após a invasão ao enterócito (BUYSSE et al., 1987; VENKATESAN; BUYSSE; KOPECKO, 1989).

Apesar da similaridade entre as cepas de EIEC e as espécies de *Shigella*, para que ocorra o processo infeccioso no homem, a dose infectante de EIEC é da ordem de 10^6 , enquanto que para *Shigella* é de 10^2 microrganismos. Ambas interagem preferencialmente com a mucosa do cólon através de um processo de invasão com várias etapas, onde múltiplos genes plasmidiais e cromossomais estão envolvidos. Clinicamente, a doença é acompanhada de febre, mal-estar, cólicas abdominais e diarreia aquosa, seguida de disenteria consistindo de poucas fezes, muco e sangue (DUPONT et al., 1971).

Mundialmente, a infecção por EIEC é de baixa incidência, sendo que a maior ocorrência se dá pelo estabelecimento de surtos. Estudos realizados em diferentes cidades brasileiras e em outras partes do mundo, apontam para uma incidência 0,25% a 1%, apenas, para cepas de EIEC (FRANZOLIN et al., 2005; GOMEZ-DUARTE et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2010; TORNIEPORTH et al., 1995), enquanto no Equador, segundo Vieira e colaboradores (2007), entre 2003 e 2005, a

prevalência de EIEC em duas comunidades locais foi de 42%, caracterizando, provavelmente, um surto, como concluído pelos autores.

2.2.5 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) está associada à diarreia persistente, ou seja, com duração maior de 14 dias, o que pode levar à má nutrição, problemas de crescimento e de desenvolvimento cognitivo infantil (HUANG et al., 2006), expressando o padrão de adesão agregativa em células epiteliais cultivadas, formando agregados que lembram tijolos empilhados (NATARO; KAPER, 1998).

No Brasil, EAEC apresenta-se como um dos principais agentes bacterianos causadores de diarreia na infância, apontado por diversos estudos como responsável por aproximadamente 20% destes casos (BUERIS et al., 2007; PEREIRA et al., 2007; PIVA et al., 2003; SCALETSKY et al., 2002).

Este patótipo também está associado à diarreia crônica em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011), como apontado por SAMIE e colaboradores (2007), em que 29,5% destes pacientes pesquisados com quadro diarreico apresentaram cepas de EAEC nas fezes, enquanto que em pacientes HIV negativos com a mesma sintomatologia, a prevalência é de 14%.

Os sintomas comumente relatados na infecção por EAEC incluem diarreia aquosa, ocasionalmente com sangue e muco, dor abdominal, náusea, vômito, anorexia e febre baixa. A diversidade de sintomas clínicos, se dá pela heterogeneidade genética e a combinação de múltiplos fatores de virulência entre os isolados de EAEC, à dose infecciosa e a fatores de susceptibilidade genética do hospedeiro, assim como, à resposta imune (HUANG et al., 2006).

Diversos marcadores moleculares são utilizados a fim de detectar EAEC por PCR, como genes do plasmídeo de virulência de EAEC (pAA), que codificam os fímbrias de aderência agregativa (AAF), regulador transcricional AggR e dispersina, assim como o gene cromossomal e específico, *aaiC*, encontrado em uma ilha de patogenicidade que codifica o sistema de secreção tipo VI, codificado pelo operon

aai (*AggR-activated island.*), composto por 25 genes (de *aaiA* até *aaiY*) (ANDRADE et al., 2014; DUDLEY et al., 2006; HUANG et al., 2006).

2.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DEC

Ao longo dos anos, o perfil etiológico da diarreia infantil sofreu alterações, evidenciando que as cepas de DEC são preponderantes nos quadros bacterianos, tendo sua identificação baseada nas características de virulência detectados por testes que demandam tempo e por testes genotípicos e fenotípicos laboriosos, como a cultura, identificação de antígenos somáticos (O), aderência em células HEp-2 cultivadas e testes de citotoxicidade. Apesar das diversas técnicas disponíveis, muitos casos de diarreia permanecem sem definição da etiologia por não abordarem corretamente os fatores de virulência, dificultando a implementação de políticas de vigilância, estratégias de mapeamento e controle de áreas endêmicas destes patógenos (GUIMARÃES et al., 2001; PLATTS-MILLS; OPERARIO; HOUPPT, 2012; SOUZA et al., 2002; SOUZA et al., 2013).

O advento do diagnóstico molecular, envolvendo geralmente amplificação de DNA, pela Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction – PCR*), trouxe a possibilidade de uma maior sensibilidade no diagnóstico das doenças infecciosas, por requerer uma carga baixa de patógenos nas amostras analisadas e detectar genes específicos da patogenicidade de diversos isolados bacterianos, com simples identificação (PLATTS-MILLS; OPERARIO; HOUPPT, 2012).

Como os mecanismos que caracterizam *E. coli* são geneticamente codificados por cromossomo, ilhas de patogenicidade, plasmídeos e bacteriófagos, havendo também a necessidade de diferenciar as espécies patogênicas de não patogênicas da microbiota intestinal, tem-se que a PCR oferece um sistema confiável por amplificar uma região específica do DNA, permitindo a detecção de determinado *locus* de virulência, de forma rápida (PASS; ODEDRA; BATT, 2000; PATON; PATON, 1998).

Ao tentar caracterizar os diferentes fatores de virulência de DEC, conduzir-se-iam diversas reações de PCR a fim de concluir a cepa patogênica responsável pela contaminação de determinada amostra. Para minimizar o número de reações, há a possibilidade de utilização de reações múltiplas de PCR (multiplex PCR), reduzindo-

se o custo e o tempo despendido ao diagnóstico, como descritas por diferentes autores (FUJIOKA; OTOMO; AHSAN, 2013; KIMATA et al., 2005; PASS; ODEDRA; BATT, 2000).

Estudos abordando multiplex PCR geralmente são realizados utilizando sistemas para identificação de diferentes genes em um mesmo patótipo de *E. coli* (RUMI et al., 2012) ou sistemas identificando diferentes patótipos, mas, geralmente, com amostras fecais humanas ou animais, apenas (COSTA et al., 2010; FUJIOKA; OTOMO; AHSAN, 2013; PASS; ODEDRA; BATT, 2000).

3 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, F.B. *et al.* A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Microbiol Methods**, v. 106, p. 16-8, Nov 2014.
- ANDRADE, J. A.; FAGUNDES-NETO, U. Persistent diarrhea: still an important challenge for the pediatrician. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 3, p. 199-205, May-Jun 2011.
- BANDO, S. Y. *et al.* Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. **FEMS Microbiol Lett**, v. 299, n. 1, p. 22-30, Oct 2009.
- BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. [Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): principal virulence factors and epidemiology]. **Semina**, v. 28, n. 2, p. 81-92, Jul-Dez 2007.
- BLANCO, M. *et al.* Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 2, p. 645-51, Feb 2004.
- BUERIS, V. *et al.* Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-44, Nov 2007.
- BÜHLER, H. F. *et al.* [Spatial analysis of integrated determinant indicators of mortality from acute diarrhea in children under 1 year of age in geographical regions]. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 19, n. 10, p. 4131-40, Oct 2014.
- BÜRK, C. *et al.* Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 2106-12, May 2003.
- BUYSSE, J. M. *et al.* Molecular cloning of invasion plasmid antigen (*ipa*) genes from *Shigella flexneri*: analysis of *ipa* gene products and genetic mapping. **J Bacteriol**, v. 169, n. 6, p. 2561-9, Jun 1987.
- CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic E. coli O serogroups-a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-52, Oct 2004.
- CHOKOSHVILI, O. *et al.* Investigation of an outbreak of bloody diarrhea complicated with hemolytic uremic syndrome. **J Epidemiol Glob Health**, v. 4, n. 4, p. 249-59, Dec 2014.
- CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*-an emerging problem? **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 41, n. 3, p. 93-8, Nov 2001.

CLEARY, J. *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 527-38, Mar 2004.

CLEMENTS, A. *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, Mar-Apr 2012.

COSTA, A. R. F. *et al.* Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreiológicas. **Rev Pan-Amz Saúde**, v. 1, n. 2, p. 77-84, Jun 2010.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 26-38, Jan 2010.

DANTAS, R. O. Diarreia e constipação intestinal. **Rev. Medicina**, v. 37, p. 262-6, Jul-Dez 2004.

DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.; FINLAY, B. B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. **Trends Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 109-14, Mar 1997.

DUDLEY, E. G. *et al.* Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 1267-82, Sep 2006.

DUPONT, H. L. *et al.* Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **N Engl J Med**, v. 285, n. 1, p. 1-9, Jul 1971.

EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEN, A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 12, p. 4585-93, Dec 2002.

FISCHER WALKER, C. L. *et al.* Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. **BMC Public Health**, v. 12, p. 220-6, Mar 2012.

FOUHY, F. *et al.* Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. **Gut Microbes**, v. 3, n. 3, p. 203-20, May-Jun 2012.

FRANÇA, E. *et al.* Association between socioeconomic factors and infant deaths due to diarrhea, pneumonia, and malnutrition in a metropolitan area of Southeast Brazil: a case-control study. **Cad Saude Publica**, v. 17, n. 6, p. 1437-47, Nov-Dec 2001.

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

FUJIOKA, M.; OTOMO, Y.; AHSAN, C. R. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. **J Microbiol Methods**, v. 92, n. 3, p. 289-92, Mar 2013.

GAUTHIER, A.; PUENTE, J. L.; FINLAY, B. B. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3310-9, Jun 2003.

GOMEZ-DUARTE, O. G. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with childhood diarrhoea in Colombia, South America. **J Infect Dev Ctries**, v. 7, n. 5, p. 372-81, May 2013.

GOMEZ-DUARTE, O.G. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas em Colombia. **Rev Chilena Infectol**, v. 31, n. 5, p. 577-86, Oct 2014.

GUIMARÃES, Z. A. *et al.* [Decline and social inequalities of infant mortality caused by diarrhea]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 5, p. 473-8, Sep-Oct 2001.

HERNANDES, R. T. *et al.* An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 297, n. 2, p. 137-49, Aug 2009.

HIRST, T. R. *et al.* Mechanism of toxin secretion by *Vibrio cholerae* investigated in strains harboring plasmids that encode heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 24, p. 7752-6, Dec 1984.

HUANG, D. B. *et al.* A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Med Microbiol**, v. 55, n. 10, p. 1303-11, Oct 2006.

HUNT, J. M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **Clin Lab Med**, v. 30, n. 1, p. 21-45, Mar 2010.

IIDA, M. *et al.* Classification of *perA* sequences and their correlation with autoaggregation in typical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates collected in Japan and Thailand. **Microbiol Immunol**, v. 54, n. 4, p. 184-95, Apr 2010.

JERSE, A. E.; KAPER, J. B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infect Immun**, v. 59, n. 12, p. 4302-9, Dec 1991.

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

KENNY, B. *et al.* Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511-20, Nov 1997.

KIMATA, K. *et al.* Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **Microbiol Immunol**, v. 49, n. 6, p. 485-92, Jun 2005.

- KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ**, v. 81, n. 3, p. 197-204, May 2003.
- LIMA, I. F. N. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* quantification in children stool samples using quantitative PCR. **APMIS**, v. 121, n. 7, p. 643-51, Jul 2013.
- LOUREIRO, E. C. B. *et al.* Detecção de bactérias enteropatogênicos e enteroparasitas em pacientes com diarreia aguda em Juruti, Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 1, p. 143-48, Mar 2010.
- MCDANIEL, T. K. *et al.* A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 5, p. 1664-8, Feb 1995.
- MCDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Mol Microbiol**, v. 23, n. 2, p. 399-407, Jan 1997.
- MELLIES, J. L. *et al.* The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Mol Microbiol**, v. 33, n. 2, p. 296-306, Jul 1999.
- MOURA, M. R. S. A. L. *et al.* Frequência de *Escherichia coli* e sua sensibilidade aos antimicrobianos em menores de cinco anos hospitalizados por diarreia aguda. **Rev Bras Saude Mater Infant**, v. 12, n. 2, p. 173-82, Jun 2012.
- MÜLLER, E. E.; EHLERS, M. M.; GRABOW, W. O. The occurrence of *E. coli* O157:H7 in South African water sources intended for direct and indirect human consumption. **Water Res**, v. 35, n. 13, p. 3085-8, Sep 2001.
- NADA, R. A. *et al.* Design and validation of a multiplex polymerase chain reaction for the identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and associated colonization factor antigens. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 67, n. 2, p. 134-42, Jun 2010.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan 1998.
- NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, n. 1, p. 13-24, Jan-Feb 2011.
- OLIVEIRA, T. C.; LATORRE, M. O. R. Trends in hospital admission and infant mortality from diarrhea: Brazil, 1995-2005. **Rev Saude Publica**, v. 44, n. 1, p. 102-11, Feb 2010.
- PASS, M. A.; ODEDRA, R.; BATT, R. M. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 5, p. 2001-4, May 2000.

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

PELAYO, J. S. *et al.* Virulence properties of atypical EPEC strains. **J Med Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 41-9, Jan 1999.

PEREIRA, A. L. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. **J Infect Dis**, v. 195, n. 3, p. 366-71, Feb 2007.

PETRI, W. A. *et al.* Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1277-90, Apr 2008.

PHALIPON, A.; SANSONETTI, P. J. *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 119-29, Feb-Mar 2007.

PIVA, I. C. *et al.* Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 1827-32, May 2003.

PLATTS-MILLS, J. A.; OPERARIO, D. J.; HOUPPT, E. R. Molecular diagnosis of diarrhea: current status and future potential. **Curr Infect Dis Rep**, v. 14, n. 1, p. 41-6, Feb 2012.

PUÑO-SARMIENTO, J. *et al.* Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. **Vet Microbiol**, v. 166, n. 3-4, p. 676-80, Oct 2013.

QADRI, F. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 3, p. 465-83, Jul 2005.

RAJENDRAN, P. *et al.* Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, n. 2, p. 117-22, Oct 2010.

REGUA-MANGIA, A. H. *et al.* Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J Infect**, v. 48, n. 2, p. 161-7, Feb 2004.

ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 4, p. 467-75, Apr 2002.

ROCHA, S. P. *et al.* Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be attaching-and-effacing negative in cultured epithelial cells. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, p. 1833-41, May 2011.

- RODAS, C. *et al.* Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 2, p. 132-7, Mar-Apr 2011.
- RUMI, M. V. *et al.* First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n. 4, p. 358-63, Apr 2012.
- SAMIE, A. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 1, p. 142-50, Jul 2007.
- SCALETSKY, I. C. *et al.* HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 8, p. 855-8, Aug 2002.
- SCHUROFF, P. A. *et al.* Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*, potencialmente patogênicas oriundas de estação de tratamento de água. **Arq Ciênc Saúde**, v. 21, n. 3, p. 93-8, Jul-Set 2014.
- SETHABUTR, O. *et al.* Detection of PCR products of the ipaH gene from *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by enzyme linked immunosorbent assay. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 37, n. 1, p. 11-6, May 2000.
- SILVA, J. A.; DA SILVA, W. D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa os enterócitos. **Rev Pat Trop**, v. 34, n. 3, Set-Dez 2005.
- SOUZA, E. C. *et al.* [Etiologic profile of acute diarrhea in children in São Paulo]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 78, n. 1, p. 31-8, Jan-Feb 2002.
- SOUZA, T. B. *et al.* Real-time multiplex PCR assay and melting curve analysis for identifying diarrheagenic *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 1031-3, Mar 2013.
- TORNIEPORTH, N. G. *et al.* Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 1371-4, May 1995.
- TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 5, p. 508-13, May 2002.
- VAN DEN BELD, M. J.; REUBSAET, F. A. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 6, p. 899-904, Jun 2012.

VENKATESAN, M. M.; BUYSSE, J. M.; KOPECKO, D. J. Use of *Shigella flexneri ipaC* and *ipaH* gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 12, p. 2687-91, Dec 1989.

VIEIRA, N. *et al.* High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 3, p. 528-33, Mar 2007.

VILA ESTAPÉ, J.; ZBOROMYRSKA, Y. [Outbreaks caused by diarrheagenic *Escherichia coli*]. **Gastroenterol Hepatol**, v. 35, n. 2, p. 89-93, Feb 2012.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 7, p. 3687-94, 2003.

4 TRABALHO CIENTÍFICO

4.1 New multiplex PCR to detection diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from stool and water samples

Jeanne Weber Vendruscolo¹; Taynara De Lacqua Waldrich¹; Gustavo Issamu Asai Saikawa¹; Jacinta Sanchez Pelayo¹; Renata Katsuko Takayama Kobayashi¹; Gerson Nakazato¹; Sérgio Paulo Dejato Da Rocha¹

1 – Department of Microbiology, Centre of Biological Science, State University of Londrina.

Corresponding address:

Sérgio Paulo Dejato da Rocha

Department of Microbiology, Centre of Biological Science, State University of Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid PO-BOX 6001, 86051-980, Londrina, Paraná, Brazil.

E-mail: rochaspd@uel.br

ABSTRACT

Considered the second worldwide cause of infant mortality, diarrhea is a neglected clinical manifestation, especially for its laborious microbiological diagnosis. The disease is caused by a wide variety of pathogens, including the category of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC), which covers the pathotypes enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC), differing from each other by virulence factors resulting in different forms of aggression to enterocytes. In order to develop a multiplex PCR system for safe and proper

identification of five main pathotypes of DEC were determined seven pairs of primers for the following genes: *aaiC*, *escV*, *bfpA*, *ipaH*, *elt*, *stx1* and *stx2*. For the validation of the system were analyzed 413 strains, previously characterized. The sensitivity data were grouped by pathotype, whereas 92.7% of atypical EPEC strains correlated, well as STEC 72.8%, 81.35% EAEC, 100% typical EPEC, ETEC and EIEC. PCR products satisfy the concern for maintaining proper resolution agarose gel in order to avoid mistakes in reading the results with product ranging between 130 to 530pb.

Keywords: diarrheagenic *Escherichia coli*, multiplex PCR, diagnosis.

1. INTRODUCTION

Diarrhea is one of the major causes of mortality among children in developing countries, with the strains of *Escherichia coli* diarrheagenic (DEC) between the main bacterial agents, with more categories epidemiologically associated with diarrhea: enteropathogenic *E. coli* (EPEC) , enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) [1].

As the virulence genes that characterize *E. coli* are genetically coded by chromosome, pathogenicity islands, plasmids and bacteriophages, it follows that the polymerase chain reaction (PCR) provides a reliable system for amplifying a specific region of DNA, assisting in policy the epidemiological surveillance and control of endemic areas [2].

In this work five primers were designed from the analysis of gene sequences published in the database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI),

confronted the *MPPrimer* program, using the specificity of the analysis the reference strains: EAEC 042 (GenBank accession number: FN554766.1), EHEC O157:H7 (GenBank accession number: JX206444.1), EIEC 53638 O144 (GenBank accession number: CP001064.1), EPEC O127:H6 (GenBank accession number: FM180569.1) and ETEC H104:O7 (GenBank accession number: EU113248.1). The strains used in this study belong to the collections of Bacteriology and Bacteriology Basic and Applied Laboratories of State University of Londrina, obtained between 2012 and 2015. A total of 413 *E. coli* isolates from different sources sampling: 189 strains of animal stool, 54 strains of water and 170 strains of human stool. Of these, the positivity for one or more genes of DEC corresponds to 109 strains (57.7%), 9 strains (16.7%) and 65 strains (38.2%), respectively, totaling 183 isolates of DEC and 230 isolates *E. coli* nonpathogenic. The collection was characterized using the following primers: EAEC (*aggR*) [3], EIEC (*ipaH*) [4], STEC (*stx1*, *stx2* and *eae*) [5], EPEC (*eae* and *bfpA*) [5,6] and ETEC (*elt*) [4]. The *E. coli* DH5 α and others enterobacteria: *Shigella flexneri* M90T, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 K6, *Proteus mirabilis* HI 4320, were used as negative control. Two pairs of primers were used of literature (*stx1* and *stx2*) [7].

The strains analyzed by PCR were grown in Luria-Bertani agar and incubated at 37°C/24 hours, with bacterial DNA extracted by boiling. The multiplex PCR reactions were performed in a thermocycler (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems™) to the following schedule: 95°C/5min, 15 cycles of 95°C/1min, 62°C/2min and 72°C/2min, 20 cycles of 95°C/1min, 58°C/2,5 min and 72°C/1min and final extension at 72°C/7min, using it in all analyzes, resulting in three multiplex PCR systems, with final volume of 25 μ L. (Table 1).

All primers were shown to be specific for the respective patterns of *E. coli*, with minimum sensitivity of 5.2ng/ μ L. For other Enterobacteriaceae, the *ipaH* gene was positive for *Shigella*. The PCR products were separated on agarose gel 2.5% referred to the potential difference (70V) for 1 hour (Figure 1).

The results were compared following the analysis previously carried out, comparing the presence of specific genes for each pathotype, indicating that the 185 strains tested with positive results DEC, obtained by multiplex PCR positivity in 160 isolates. Of these, 88 samples were isolated from animal stool samples of 45 human stool samples and 27 water samples (Table 2).

Molecular analysis of virulence factors is extensively studied and characterized, enabling their possible diagnostic application in the laboratory routine. However, the genetic diversity of DEC strains makes the laborious identification involves a series of molecular tests in order to define exactly pathotype involved in the infection. Studies seeking to develop a diagnostic tool to optimize time, by multiplex PCR are reported [8, 9]. The present study aimed at the development of this tool, capable to differentiate between the five main DEC categories for determining 7 pairs of primers in 3 different systems using the same programming thermocycler, with the possibility of different origins strains analysis with adequate visualization of the PCR products in agarose gel electrophoresis, maintaining good resolvability between PCR products ensuring that the visualization of the results, there were no uncertainty in reading. In the work of Fujioka et al (2013), that by developing a multiplex PCR to search 10 genes into five main categories of DEC in a single reaction, and the visualization of the results was affected by not keeping a safe distance between the PCR products.

Moreover, our work aimed to allow different strains isolated from different

sources (water and human and animal feces) were analyzed. Different multiplex systems PCR of DEC detection have been developed, however, the analysis were restricted to fecal samples from humans or animals, or not distinguish five major classes of DEC, necessitating other PCR reactions for verification of results [2, 8, 9, 10].

According to comparisons between the pretest and the results of multiplex PCR (Table 2), to atypical EPEC strains, the sensitivity reached 91.3% in the samples of animal stool, 86.7% in human stool and 100% in water. As for STEC strains, reached 51.7% for animal stool, 66.7% to human stool and 100% for water samples. This heterogeneity of the results is given probably by genetic variability *stx2* [5].

The sensitivity for typical EPEC, ETEC and EIEC strains was 100%. Although the occurrence for these pathotypes is low, it is to be mentioned that its importance is given by the establishment of outbreaks [11].

For search EAEC strains, Laboratories Collection have choosed the use of primer for *aggR* to detection this pathotype. This study opted for the application of a chromosomal gene (*aaiC*). The results of *aaiC* and *aggR* showed that the difference between the molecular diagnosis of chromosomal and plasmid genes with the 59 samples positive for *aaiC* 48 to *aggR* (81.35%).

Therefore, the present results show that there is a possibility of detection of the major 5 pathotypes of DEC from different sources, assisting in epidemiology and diagnosis of diarrhea, with low cost, sensitivity, specificity and easy and safe viewing of the PCR products.

ACKNOWLEDGMENT

To State University of Londrina for scholarship of Saikawa G.I.A. To

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for scholarship of Vendruscolo J.W. To Fundação Araucaria (Agreement PPSUS-04/2013), for financial support to this project.

REFERENCES

1. CLEMENTS, A. *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, Mar-Apr 2012.
2. PASS, M. A. *et al.* Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 5, p. 2001-4, May 2000.
3. BOISEN, N. *et al.* Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J Infect Dis**, v. 205, n. 3, p. 431-4, Feb 2012.
4. ARANDA, K. R. S. *et al.* Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiol Lett**, v. 267, p. 145-50, Feb 2007.
5. PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 450-79, Jul 1998.
6. GUNZBURG, S. T. *et al.* Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus genes. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 1375-7, May 1995.
7. LEOTTA, G. A. *et al.* Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. **Rev Argent Microbiol**, v. 37, n. 1, p. 1-10, Mar 2005.
8. RUMI, M. V. *et al.* First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n. 4, p. 358-63, Apr 2012.
9. FUJIOKA, M. *et al.* A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. **J Microbiol Methods**, v. 92, n. 3, p. 289-92, Mar 2013.
10. OH, K. H. *et al.* Development of a one-step PCR assay with nine primer pairs for the detection of five diarrheagenic *Escherichia coli* types. **J Microbiol Biotechnol**, v. 24, n. 6, p. 862-8, Jun 2014.
11. OCHOA, T. J. *et al.* New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 9, p. 852-6, Sep 2008.

Table 1 – Description of oligonucleotides outlined in this work and the reagent concentrations used in the three systems

Target gene (GenBank accession number)	Type of PCR	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Final concentration (mM)	Reagents	Reference
<i>aaiC</i> (FN554766.1)	System 1	AGAGCGTCCACTGTCAGAGCGT GCGACCTGCTCTGGCGTGAAAT	183	400	Buffer: 1x MgCl: 2,2mM	This study
<i>escV</i> (FM180568.1)	System 1	TAACGCCTGCGCGCATATCACC GTTGATGCGCCTGTCGCTAGT	266	400	dNTP: 0,46mM each	This study
<i>bfpA</i> (FM180569.1)	System 1	TCTGCAATGGTGCTTGCGCTTG CAGTTGCCGCTTCAGCAGGAGT	478	480	TAQ polymerase: 2,5U	This study
<i>stx1</i> (JX206444.1)	System 2	AGCGATGCAGCTATTAATAA GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	480	Buffer: 1x MgCl: 2,2mM	Leotta et al., 2005
<i>ipaH</i> (CP001064.1)	System 2	CAGGTCGCTGCATGGCTGGAAA GGCAGTGCGGAGGTCATTTGCT	393	480	dNTP: 0,46mM each TAQ polymerase: 3U	This study
<i>stx2</i> (AY633471.1)	System 3	TTAACCACACCCACCGGGCAG T GCTCGGATGCATCTCTGGT	346	560	Buffer: 1x MgCl: 2,2mM	Leotta et al., 2005
<i>elt</i> (EU113248.1)	System 3	AGGCGTATACAGCCCTCACCCA ACCTGAAATGTTGCGCCGCTCT	530	480	dNTP: 0,46mM each TAQ polymerase: 3U	This study

Genes and pathotype: *aaiC* (EAEC), *escV* (atypical EPEC), *escV* and *bfpA* (typical EPEC), *escV* and *stx1* and or *stx2* (EHEC), *stx1* and or *stx2* (STEC), *ipaH* (EIEC), *elt* (ETEC).

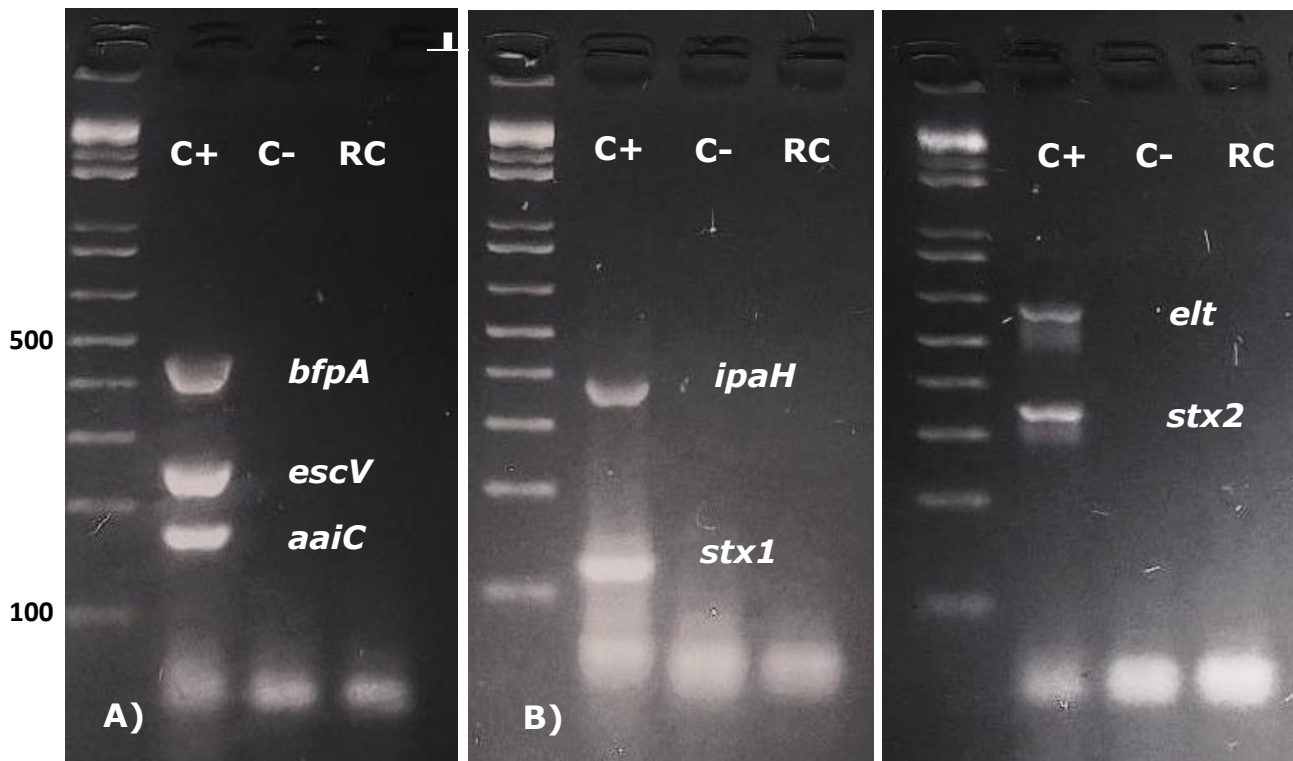


Figure 1. Profile electrophoretic of the characteristic *loci* amplified in multiplex PCR systems 1, 2 and 3 in a 2,5% agarose gel. A) System mPCR1 genes: *bfpA*, *escV* and *aaiC*. B) System mPCR2 genes: *ipaH* and *stx1*. C) System mPCR3 genes: *elt* and *stx2*. C+: positive control; C-: negative control; RC: reaction control (no DNA).

Table 2 - Comparison between the Collection and the new multiplex PCR reactions

PATHOTYPE	COLLECTION			MULTIPLEX PCR		
	WATER	HUMAN STOOL	ANIMAL STOOL	WATER	HUMAN STOOL	ANIMAL STOOL
aEPEC	6	15	23	6	13	21
tEPEC	-	10	-	-	10	-
EIEC	-	-	2	-	-	2
STEC	3	3	60	3	2	31
EAEC	-	37	11	18	20	21
ETEC	-	-	13	-	-	13
Positive	9	65	109	27	45	88
Negative	45	105	80	27	125	101
Total	54	170	189	54	170	189

aEPEC = atypical EPEC. tEPEC = typical EPEC.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que há a possibilidade de diagnóstico dos 5 principais patótipos de DEC (EAEC, EPEC típica e atípica, STEC, EIEC e ETEC) de forma mais eficiente, através de multiplex PCR, auxiliando na epidemiologia e diagnóstico de diarreias, com visualização fácil e segura dos produtos, podendo pesquisar os fatores de virulência de DEC em diferentes amostras e de forma simultânea, garantindo a agilidade exigida dos laboratórios clínicos, com iniciadores inovadores e bem padronizados.