



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANGÉLICA MARIM LOPES

**PREVALÊNCIA DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA EM
CRIANÇAS COM DIARREIA NO NORTE DO ESTADO DO
PARANÁ**

Londrina
2015

ANGÉLICA MARIM LOPES

**PREVALÊNCIA DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA EM
CRIANÇAS COM DIARREIA NO NORTE DO ESTADO DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L864p Lopes, Angélica Marim.

Prevalência de *Escherichia coli* diarreio gênica em crianças com diarreia no norte do estado do Paraná / Angélica Marim Lopes. – Londrina, 2015.
58 f. : il.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* – Teses. 2. Genética bacteriana – Teses. 3. Diarreia em crianças – Teses. 4. Virulência – Teses. 5. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 576.851.48

ANGÉLICA MARIM LOPES

**PREVALÊNCIA DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA EM
CRIANÇAS COM DIARREIA NO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez
Pelayo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Profa. Dra. Renata KatsukoTakayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de abril de 2015.

Dedico este trabalho ao meu marido Rodrigo, aos meus pais Carlos e Elizabete, aos meus irmãos Jéssica e Vinícius, aos meus avôs Francisco (in memorian) e Liberata e a toda minha família que, com muito amor, me apoiaram nessa longa jornada, me ajudaram a construir o que sou e a concretizar mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela força, fé, sabedoria e pela sua presença constante em minha vida, o que foi fundamental não somente na realização deste trabalho, mas em todas as conquistas pessoais e profissionais.

Ao amor da minha vida, o meu marido Rodrigo, companheiro de todas as horas, pelo amor, paciência, compreensão e espírito de sacrifício ao longo destes dois anos, acreditando em mim e na conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Elizabete e Carlos, por tudo que me ensinaram, pelo exemplo de vida, apoio incondicional e oportunidade de poder concretizar um sonho.

Aos meus irmãos Jéssica e Vinícius, pela paciência, por permanecerem sempre ao meu lado nas dificuldades independente da distância e me incentivarem a continuar nessa jornada.

À minha vó Liberata, que com toda sua experiência nunca me deixou desistir diante dos meus fracasso e a toda minha família pelo amor e carinho.

À minha orientadora Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo pela ajuda, conhecimentos transmitidos, disponibilidade, acolhida, conselhos, mas sobretudo pela sua amizade, seu carinho e sua dedicação, que são sentimentos que ficarão eternamente em meu coração.

Aos amigos Tatiane, Paulo e Nicole pela grande e indispensável ajuda, amizade, pelo companheirismo, pelos conselhos, motivação, momentos de risadas, em especial pelo carinho que me acolheram no laboratório.

À amiga Daniele, pela forte presença ao longo desses anos em quase todos os momentos de minha vida e pelo seu carinho para comigo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha e colegas de laboratório Claci, Anahí, João, Cynthia, Kawana e Caroline pela colaboração em meus experimentos e momentos de alegria.

À Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero e Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi por aceitarem serem membros da minha banca de dissertação, pela contribuição e ajuda inestimável.

Ao Laboratório de Virologia da UEL pelo fornecimento de cultivo de células e a todos os colegas, funcionários e professores do Laboratório de Microbiologia do Hospital Univesitário de Londrina pela colaboração na coleta de material para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para meu crescimento e para a realização deste trabalho. **MUITO OBRIGADA!**

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.” (Isaac Newton)

LOPES, Angélica Marim. **Prevalência de *Escherichia coli* diarreio gênica em crianças com diarreia no norte do estado do Paraná.** 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Escherichia coli diarreio gênica (DEC) são importantes agentes patogênicos entéricos que causam inúmeras doenças gastrointestinais, particularmente entre crianças nos países em desenvolvimento, resultando em significativa morbidade e mortalidade. No período de 2013 a 2014, 426 colônias de *E. coli* foram isoladas de 71 amostras de fezes de crianças com diarreia entre zero e 12 anos de idade, do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, no Paraná, Brasil. Os genes de virulência dos cinco patótipos de DEC pesquisados neste estudo foram determinados utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O ensaio de aderência em células HEP-2 foi realizado em todas as amostras estudadas para caracterização fenotípica. Foram encontradas 87,4% de DEC entre as amostras pesquisadas, sendo 8,5% de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), todas do subgrupo de EPEC atípica, 4,2% de *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), 8,5% de *E. coli* enteroagregativa típica (tEAEC) e 66,2% de EAEC atípica (aEAEC). No entanto, os genes dos outros patótipos pesquisados nesse trabalho, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) não foram encontrados nestes isolados clínicos. Entre os padrões de adesão pesquisados em cultura de células HEP-2 o padrão agregativo foi predominante nestas amostras. Assim, foi possível demonstrar que DEC ainda são patógenos importantes na etiologia da diarreia infantil e que estudos epidemiológicos podem ajudar a minimizar os possíveis perigos desses patógenos, acarretados à saúde pública.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Diarreia. Crianças. Genes. Patótipos.

LOPES, Angélica Marim. **Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with diarrhea in the north of Paraná state.** 2015. 58 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) are important enteric pathogens that cause several gastrointestinal diseases, particularly among children in developing countries, resulting in significant morbidity and mortality. A total of 426 *E. coli* colonies were isolated from 71 stool samples from children with diarrhea between zero and 12 years old, of University Hospital of the State University of Londrina, Paraná, Brazil, during 2013 and 2014. Virulence genes of the five DEC pathotypes investigated in this study were determined using the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). The HEp-2 cell adherence assay was performed on all samples analyzed for phenotypic characterization. It was found among the samples studied 87.4% of DEC, with 8.5% of Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), all of atypical EPEC (aEPEC) subgroup, 4.2% of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), 8.5% of typical Enteroaggregative *E. coli* (tEAEC) and 66.2% of atypical EAEC (aEAEC). However, genes of other pathotypes studied in this work, Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) were not found. The ability to adhere to HEp-2 cell culture was evaluated and the aggregative adhesion pattern predominated in these isolates. Thus, it was demonstrated that DEC are still important pathogens in the etiology of childhood diarrhea and epidemiological studies may help minimize the possible dangers of these pathogens against public health.

Key words: *Escherichia coli*. Diarrhea. Children. Genes. Pathotypes.

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. | REVISÃO DA LITERATURA | 13 |
| 2.1. | <i>Escherichia coli</i> | 13 |
| 2.2 | <i>Escherichia coli</i> diarréiogênicas (DEC)..... | 14 |
| 2.2.1 | <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) | 14 |
| 2.2.2 | <i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga (STEC) | 17 |
| 2.2.3 | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC) | 20 |
| 2.2.4 | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)..... | 22 |
| 2.2.5 | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC)..... | 24 |
| 3. | REFERÊNCIAS | 26 |
| 4. | OBJETIVOS | 37 |
| 4.1 | Objetivo Geral | 37 |
| 4.2 | Objetivos Específicos..... | 37 |
| 5. | TRABALHO CIENTÍFICO | 38 |
| 6. | CONCLUSÃO | 57 |

1 INTRODUÇÃO

No século XX, o Brasil passou por intensas transformações na sua estrutura populacional e no padrão de morbimortalidade. Entretanto, as doenças infecciosas ainda se apresentam como problemas importantes de morbidade, principalmente entre crianças (BARRETO; CARMO, 2007). Dentre essas doenças destacam-se as infecções intestinais, sendo *Escherichia coli* um dos principais agentes etiológicos dessas infecções, classificadas como diarreia ou disenteria (O'RYAN; PRADO; PICKERING, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) conceituam "diarreia" como uma alteração intestinal caracterizada pela ocorrência de evacuações líquidas ou de consistência diminuída em três ou mais episódios em 24 horas, ou ainda uma única semilíquida contendo muco e sangue no período de 12 horas. Em geral, é um sintoma de infecção gastrointestinal, que pode ser causado por uma variedade de agentes etiológicos. A infecção é transmitida através de alimentos e água contaminados ou de pessoa para pessoa, como resultado da falta de higiene. (WHO; UNICEF, 2013).

A diarreia é a terceira causa mais comum de morte em crianças menores de cinco anos de idade, seguida da pneumonia e das doenças neonatais. Globalmente, há cerca de 1,7 bilhões de casos a cada ano, sendo que cerca de 760.000 crianças dessa mesma faixa etária morrem vítimas dessa enfermidade. Nos países em desenvolvimento, as crianças com menos de três anos de idade, têm em média, três episódios de diarreia por ano. Cada episódio priva a criança da nutrição necessária para o crescimento e como resultado, a diarreia é uma das principais causas da desnutrição (WHO; UNICEF, 2013).

No Brasil, os indicadores básicos do país mostram disparidades regionais com relação à taxa de mortalidade infantil, que apresenta tendência descendente há mais de 10 anos. As regiões Norte e Nordeste mostram as maiores taxas, e em torno de 80% dos óbitos por diarreia foram em menores de 1 ano no período de 2000 a 2010 (OPAS, 2009; BRASIL, 2011). Em estudo mais recente realizado por Bühler et al. (2014), os resultados refletem a coerência de análises pelos indicadores básicos para diarreia, apontando no intervalo de faixa etária para menores de 5 anos, que os menores de 1 ano são mais vulneráveis e porções territoriais com riscos concentram-se nas regiões Norte e Nordeste.

Na maioria dos casos, a diarreia tem como agentes etiológicos os vírus e as bactérias, independentemente da região geográfica. Entretanto, algumas vezes, nas áreas onde as enteroparasitoses são endêmicas, os parasitas intestinais principalmente os protozoários, também podem causar o processo diarreico. (CHENG; MCDONALD; THIELMAN, 2005).

Conforme Walker e Black (2010), os estudos epidemiológicos em áreas com maior frequência de doença diarreica revelam que os agentes infecciosos bacterianos mais comuns são *E. coli* (pertencentes aos patótipos de *E. coli* diarreogênicas), *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica*. Nas formas endêmicas de diarreia infantil, o patógeno bacteriano mais comumente associado é *E. coli* (WHO, 2002).

Devido aos possíveis perigos acarretados à saúde pública por estes patótipos de *E. coli*, são necessários estudos que evidenciem a distribuição e frequência destas cepas nos humanos, principalmente em crianças, além das características de virulência, no sentido de melhor conhecer a epidemiologia dessas infecções.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *ESCHERICHIA COLI*

A bactéria *E. coli* foi descrita primeiramente em 1885, pelo pediatra alemão Theodore Von Escherich, que a denominou, inicialmente, de *Bacterium coli comune* (CHEN; FRANKEL, 2005). Em 1919 a espécie foi renomeada *Escherichia coli* por Castellani e Calmers, em homenagem ao pesquisador que a descreveu (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008).

E. coli é um bastonete gram-negativo, anaeróbio facultativo, sendo um dos principais comensais do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente (SUSSMAN, 1997). No entanto, algumas linhagens de *E. coli* diferem das estirpes comensais, apresentando atributos de virulência característicos, o que lhes permite causar doença. Assim, essas linhagens de comportamento biológico distinto das cepas comensais foram classificadas em patótipos, conforme o sítio ou tipo de infecção que são capazes de causar (CROXEN; FINLAY, 2010).

As infecções por *E. coli* patogênicas podem ser limitadas às superfícies de mucosas ou podem disseminar por todo o corpo. Dentre as principais infecções causadas por *E. coli* estão as infecções extra-intestinais (NATARO; KAPER, 1998). As cepas de *E. coli* associadas a infecções extra-intestinais são conhecidas por ExPEC (RUSSO; JOHNSON, 2000). Em humanos, são responsáveis por importantes patologias como septicemia, infecções do trato urinário (ITU) e meningite neonatal (PITOUT, 2012).

Além disso, alguns clones específicos de *E. coli* são causadores de infecções intestinais sempre que alcançam esse sítio anatômico, tanto em humanos quanto em outros animais não sendo, portanto, membros da microbiota intestinal. Essas amostras são chamadas de *E. coli* diarreiogênicas (DEC). De modo geral, a evolução fez com que algumas cepas de *E. coli* adquirissem fatores de virulência através da transferência horizontal de genes. Por isso, a capacidade de *E. coli* de causar um amplo espectro de doenças em humanos vem aumentando nos últimos anos (NATARO; KAPER, 1998).

Na década de 40, Kauffmann (1947 apud GUASTALLI, 2010) propôs pela primeira vez, que cepas de *E. coli* fossem identificadas tendo-se como base seus principais antígenos de superfície, que são os antígenos O (somáticos),

antígenos K (capsulares), antígenos H (flagelares) e antígenos F (fimbriais). Entre as décadas de 20 e 40 essa tipagem foi muito útil e evidenciou que as linhagens de *E. coli* associadas à epidemias de diarreia, pertenciam a um número muito pequeno de sorogrupos O, particularmente O55 e O111 (HINTON; MACGREGOR, 1958 apud BUERIS, 2008).

Através de estudos sorológicos empregando reações de aglutinação com antissoros específicos, já foram identificados mais de 180 antígenos O. Em adição, também foram descritos, pelo menos 60 antígenos H e 100 antígenos K diferentes, possibilitando inúmeras combinações (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

2.2 *ESCHERICHIA COLI* DIARREIOGÊNICAS (DEC)

Cepas de *E. coli* associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos conhecidas como DEC, estão agrupadas em oito categorias, considerando os seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O e H, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interações com linhagens celulares, uma vez que a patogênese das infecções intestinais causada por essas cepas varia entre um patotipo e outro. Estes grupos de DEC são classificados como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC), *E. coli* aderente invasora (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga (STEAEC) (CLEMENTS et al., 2012). Ainda, EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria de STEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

2.2.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

O termo EPEC foi criado por Neter et al. (1955) para designar cepas de *E. coli* epidemiologicamente associadas à diarreia infantil e distingui-las das comensais (TORRES; ARENAS-HERNANDEZ; MARTINEZ-LAGUNA, 2010).

EPEC foi o primeiro patotipo de DEC identificado, descrito em 1945 durante um surto de diarreia infantil no Reino Unido (BRAY, 1945), no entanto seu potencial patogênico só foi confirmado e aceito anos depois, após estudos com voluntários que ingeriram o microrganismo e apresentaram sintomas evidentes de diarreia (LEVINE et al., 1978).

As cepas mais estudadas de EPEC pertencem a uma série de doze sorogrupos (O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158), denominados sorogrupos clássicos de EPEC (WHO, 1987).

Um dos principais fatores de virulência de EPEC é a propriedade de aderir intimamente ao epitélio da mucosa do intestino delgado causando lesão histopatológica característica conhecida como lesão AE (*attaching-effacing*), (MOON et al., 1983; KNUTTON et al., 1989). Essa adesão íntima da bactéria ao enterócito promove a destruição das microvilosidades do epitélio, levando à polimerização da actina e ao rearranjo das proteínas do citoesqueleto, resultando na formação de estruturas semelhantes a um pedestal na membrana apical do enterócito, sobre o qual a bactéria encontra-se aderida (MOON et al., 1983; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

A formação da lesão AE requer a expressão de vários genes localizados em uma ilha de patogenicidade (PAI) cromossomal de 35 kb, denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) (McDANIEL et al., 1995).

A região LEE possui os genes *eae* (EPEC *attaching-effacement*) e *tir* (*translocated intimin receptor*), os quais codificam, respectivamente, uma proteína de membrana externa de 94-kDa denominada intimina (JERSE et al., 1990) e seu receptor Tir, que é translocado para a célula epitelial (KENNY et al., 1997). Baseado nas variações antigênicas da porção C-terminal da molécula de intimina, inúmeros diferentes tipos e subtipos têm sido descritos em EPEC e EHEC (BLANCO et al., 2006; HORCAJO et al., 2011).

Em 1995, na cidade de São Paulo, Brasil, realizou-se o segundo Simpósio Internacional de *E. coli*. Nesta ocasião, as amostras de EPEC foram divididas em EPEC típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC). tEPEC são cepas que apresentam, além do gene *eae*, um plasmídeo de 60 MDa denominado EAF (EPEC *adherence factor*), o qual contém os genes envolvidos com a biogênese de uma adesina fimbrial denominada *bundle-forming pilus* (*bfp*), além da sequência genética referente ao fragmento sonda EAF e do operon *per* (*plasmid encoded regulator*), o

qual codifica genes reguladores de fatores de virulência de EPEC. Já as cepas que não apresentam o plasmídeo EAF são denominadas aEPEC (KAPER, 1996; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; ABE et al., 2009).

aEPEC podem ter se originado de tEPEC que perderam o plasmídeo EAF ou de EHEC, as quais perderem fagos que codificam as Stxs (Toxina Shiga 1 e 2) ou por apresentar outro mecanismo de virulência (KAPER, 1996).

Além disso, tEPEC e aEPEC também diferem quanto ao padrão de adesão a células epiteliais: tEPEC mostram apenas o padrão de adesão localizada (AL) (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984), enquanto que aEPEC podem apresentar, além do padrão AL os padrões de adesão difusa (AD), adesão agregativa (AA), adesão localizada-like (ALL), além de padrões de adesão não definidos (ND) e amostras não aderentes (NA) (SCALETSKY et al., 1996).

tEPEC causa uma diarreia aquosa severa, podendo ser acompanhada de febre, mal-estar e vômitos, afetando principalmente crianças de até um ano de idade em países em desenvolvimento. Já EPEC esta associada com diarreia aguda e/ou persistente em crianças e adultos, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (AFSET; BERGH; BEVANGER, 2004; NGUYEN et al., 2006).

Entre 1945 e 1965, tEPEC eram frequentemente relacionadas a surtos de diarreia nos países desenvolvidos. Enquanto a infecção por tEPEC ocorre principalmente em crianças menores de um ano (NATARO; KAPER, 1998), sendo a diarreia aguda seu principal sintoma clínico (FAGUNDES-NETO, 1996), aEPEC acomete indivíduos em diversas faixas etárias, havendo estudos que sugerem a sua associação com diarreia persistente (HERNANDES et al., 2009).

No Brasil, até a década de 90, uma elevada frequência de tEPEC era observada, no entanto, estudos epidemiológicos mais recentes têm demonstrado uma maior prevalência de sorotipos de aEPEC (FRANZOLIN et al., 2005; ARAÚJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; MORENO et al., 2008; SCALETSKY et al., 2009). A razão para estas mudanças não é clara, mas o declínio na frequência do patotipo tEPEC pode ser devido à melhoria nas condições de saneamento e ao controle mais adequado das infecções hospitalares, entre outras (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Scaletsky et al. (1999), estudando 40 amostras de fezes de crianças menores de um ano de idade com diarreia e 40 controles, encontraram cepas de

aEPEC com padrão ALL com uma frequência mais significativa em amostras diarreicas (17,5%) em comparação aos controles (2,5%). Alguns pesquisadores avaliaram a prevalência de EPEC por métodos de genética molecular, verificando a presença do gene *eae* e ausência do gene *stx*.

Regua-Mangia et al. (2004), no Rio de Janeiro, observaram prevalência de apenas 1,0% de tEPEC em 199 crianças com diarreia. Rodrigues et al. (2002), em Botucatu, não detectaram tEPEC em amostras fecais de 54 crianças com diarreia com idade inferior a 13 anos. Em estudo que incluiu crianças com idade inferior a um ano, Rodrigues et al. (2004) também não detectaram tEPEC em 126 crianças com diarreia e 39 crianças saudáveis.

Investigação realizada em Salvador (FRANZOLIN et al., 2005), envolvendo 119 crianças com diarreia, demonstrou que aEPEC foi o principal grupo diarreiogênico de *E. coli* identificado (10,1%). Estes autores relatam a detecção de tEPEC em amostra fecal de apenas uma criança (0,8%). Collares (2005) observou EPEC em cerca de 20% das crianças com diarreia aguda atendidas em hospital público de Belo Horizonte, 19,1% de aEPEC e apenas 0,9% tEPEC. Bueris et al. (2007) em estudo realizado em Salvador, analisaram 1020 crianças entre 1 a 10 anos de idade com diarreia, detectando 9,4% das amostras com aEPEC e apenas uma amostra de tEPEC. Estudo realizado em São Paulo com 774 crianças menores de cinco anos de idade, descreve aEPEC como a principal causa de enterite infecciosa na infância (ARAUJO et al., 2007).

Assim, nos últimos anos, vários estudos epidemiológicos vêm demonstrando que aEPEC é mais prevalente do que tEPEC em casos de diarreia em muitos países, inclusive no Brasil, colocando aEPEC como um patógeno emergente (MORENO et al., 2008; SCALETSKY et al., 2009).

2.2.2 *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC)

STEC foi primeiramente identificada nos Estados Unidos em 1982 de um surto de diarreia (RILEY et al., 1983), desde então, destacando-se, como bactérias emergentes relacionadas com a ingestão de alimentos e água contaminadas, uma vez que está ligada a um amplo espectro de doenças humanas, que varia desde uma diarreia leve até a uma severa diarreia sanguinolenta (Colite Hemorrágica – CH), que pode evoluir para complicações extraintestinais graves

como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), e levar a falência renal e a Púrpura Trombocitopênica (PTT), que acomete principalmente idosos (NATARO; KAPER, 1998; MORA et al., 2005).

Esse patotipo é encontrado em várias espécies de animais domésticos e selvagens, possíveis portadores assintomáticos, no entanto, os ruminantes, são considerados os principais reservatórios de STEC, incluindo o sorotipo O157:H7 (BEUTIN, 1995 apud CALDORIN et al., 2013).

A habilidade de STEC em causar doenças em humanos é associada principalmente à produção de dois tipos de citotoxinas denominadas toxinas Shiga (Stx1 e Stx2), cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese proteica nas células alvo (PATON; PATON, 1998). Estas toxinas foram inicialmente denominadas Verotoxinas (VT) devido à sua atividade citotóxica em cultura de células Vero (KONOWALCHUK; SPEIRS; STRAVIC, 1977).

Os genes *stx*₁ e *stx*₂ estão localizados em genomas de fagos que se integram ao cromossomo da célula hospedeira (GOBIUS; HIGGS; DESMARCHELIER, 2003). A presença destes genes em fagos proporciona sua disseminação entre diferentes cepas, assim como possibilita a sua coexistência em uma mesma bactéria. Assim, as STEC podem apresentar um ou mais genes *stx* simultaneamente (FÜRST et al., 2000).

Apesar do principal fator de virulência de STEC ser a produção de um ou mais tipos de *stx* (*stx*₁ e *stx*₂), outros fatores associados à doença humana já foram descritos (GYLES, 2007) e são frequentemente utilizados para caracterizar um subgrupo de STEC, formado por EHEC (CAPRIOLI et al., 2005).

EHEC caracterizam-se pela produção de toxina Shiga (Stx1 e/ou Stx2), codificadas por bacteriófagos lisogênicos (PATON; PATON, 1998) e por causarem lesão AE associado a um gene homólogo ao *eae* de EPEC que codifica uma proteína de 94 kDa caracterizada como intimina de EHEC (NATARO; KAPER, 1998). Em humanos, STEC *eae* positivo está relacionada a quadros severos de diarreia, principalmente CH e SHU (PATON; PATON, 1998).

Outro fator de virulência em cepas de STEC é a produção de uma entero-hemolisina (Ehly), considerada um marcador de alta virulência, uma vez que em grande parte dos casos de CH e SHU existe a produção concomitante de Stx e Ehly. A produção da Ehly é codificada pelo gene *ehxA*, inserido em um plasmídeo de alto peso molecular, presente tanto em amostras O157 (pO157) como em cepas do

sorotipo O26:H11 e na maioria de STEC isoladas de humanos (RIVAS, et al., 2000; COOKSON et al. 2007).

Embora haja uma forte associação entre a produção de Ehly e de Stx com a CH e a SHU (SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995 apud CALDORIN et al., 2013) ainda não foi esclarecida sua contribuição na patogenicidade de STEC. Acredita-se que a contribuição da entero-hemolisina na patogênese das doenças causadas por esse patotipo seja semelhante à de outras hemolisinas, o acesso ao elemento químico ferro, originário da lise dos eritrócitos, necessário ao metabolismo bacteriano e ao estímulo do crescimento de STEC (LAW; KELLY, 1995).

Estudos epidemiológicos têm revelado que, independentemente do sorogrupo, é a presença dos genes que codificam a toxina Shiga 2 (*stx2*) e intimina (*eae*) que está associada à doença severa (WERBER et al., 2003). Mais de 200 sorotipos de *E. coli* apresentam a capacidade de produzir Stx, entretanto o sorotipo O157:H7 é considerado o mais importante (NATARO; KAPER, 1998), reconhecido como patógeno em 1982, quando associado a dois surtos de CH de origem alimentar nos Estados Unidos (MORA et al., 2005).

Nos Estados Unidos, no Canadá, no Reino Unido e no Japão, *E. coli* O157:H7 é o sorotipo predominante de STEC, ao contrário do que ocorre na Europa Continental, na Austrália e na América do Sul, onde outros sorotipos estão mais frequentemente envolvidos nos casos de infecções humanas (CALDORIN et al., 2013). Somente nos Estados Unidos, em 1999, foram estimados aproximadamente 100.000 casos de doenças, 3.000 hospitalizações e 90 mortes causadas por STEC. Muitos casos de infecções ocasionadas por esse patotipo, nesse mesmo país, são causados por *E. coli* O157:H7, com uma estimativa de 73.000 casos ocorridos a cada ano. STEC não O157 também são importantes causas de doenças diarreicas nos Estados Unidos (GOULD et al., 2009).

Na Argentina, *E. coli* O157:H7 tem sido responsável por muitos casos de SHU, tornando essa síndrome uma doença endêmica. Nesse país, há um dos índices mais altos do mundo dessa doença, atingindo 12,2 casos a cada 100.000 crianças menores de cinco anos de idade, em 2002 (RIVAS et al., 2006). No Brasil, até o momento, foram caracterizadas três cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de fezes de pacientes no Estado de São Paulo, pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL). Em 1990, foi isolada a primeira cepa de um paciente com 18 anos de idade, com diarreia, e que apresentava Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). As

outras duas cepas foram isoladas de um adulto, com diarreia severa, e de uma paciente com quatro anos de idade, com diarreia sanguinolenta, ambos hospitalizados no município de Campinas, São Paulo, em 2001 (IRINO et al. 2002 apud CALDORIN et al., 2013). Recentemente, Souza et al. (2011), analisando dados do centro de vigilância epidemiológica no Estado de São Paulo observaram baixa incidência de SHU entre crianças internadas em Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica entre 1998 e 2007.

Sendo assim, torna-se importante para a saúde pública da população, a obtenção de informações sobre a epidemiologia de STEC e de seus reservatórios, visto o aumento gradativo de surtos de doenças transmitidas, principalmente por alimentos em todo o mundo (PAULA, 2014).

2.2.3 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC são identificadas por sua habilidade em produzir o padrão de adesão agregativo (AA) em cultura de células epiteliais, como em células HEp-2 e HeLa. O termo AA foi estabelecido por Nataro et al. (1987), para definir o padrão de adesão em células HEp-2 apresentado por amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico envolvendo crianças com diarreia no Chile. 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 formando agregados heterogêneos (NATARO et al., 1987 apud ANDRADE; HAAPALAINEN; FAGUNDES-NETO, 2011).

Diversos estudos demonstram que o fenótipo AA em várias amostras é associado principalmente com a presença de adesinas de origem fimbriais. Nas adesinas de origem fimbrial destacamos as *Aggregative Adherence Fimbriae* (AAFs) na qual incluem quatro principais variantes (AAF/I ao AAF/IV), com distintas estruturas nas subunidades da pilina (NATARO, et al., 1992; BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; BOISEN, et al., 2008).

O gene *aggR* é outro importante gene da patogênese e das propriedades agregativas de EAEC. Este gene é um importante ativador transcricional que promove a expressão de fatores de virulência tanto plasmidiais quanto cromossomais, incluindo a AAF (DUDLEY et al., 2006). Nataro e Kaper

(1998) sugeriram o termo EAEC típica para as cepas que apresentavam o gene regulador *aggR* e EAEC atípicas para as que não apresentavam o gene *aggR*.

O padrão AA demonstrado no teste de adesão em células HeLa ou HEp-2 é usado como diagnóstico padrão (*gold standard*) para a classificação de EAEC (NATARO; KAPER; 1998). No entanto, recentemente, alternativas ao ensaio de adesão têm sido desenvolvidas para a detecção de genes de virulência de EAEC (LIMA, et al., 2013; ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014).

Inúmeros genes vêm sendo utilizados para o diagnóstico de EAEC, devido à heterogeneidade das cepas estudos relatam que a virulência deste patotipo normalmente resulta da combinação de vários marcadores (HUANG; JIANG; DUPONT, 2003; TOKUDA, et al., 2010).

A grande maioria dos protocolos de PCR propõe apenas a detecção de genes plasmidiais, na qual desfavorece a detecção de cepas atípicas (CERNA; NATARO; GARCIA-ESTRADA, 2003; RÜTTLER, et al., 2006). Nos últimos anos, algumas regiões cromossomais vêm sendo utilizadas para a detecção de cepas de EAEC atípicas (JENKINS, et al., 2006; LIMA, et al., 2013). Dentre os genes cromossomais específicos para EAEC temos os genes *aaiC*, *aaiA* e *aaiG* (DUDLEY, et al., 2006; LIMA, et al., 2013; ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014).

Importantes fatores de virulência foram descritos em EAEC, mas a patogênese da diarreia causada por esse patotipo ainda não foi esclarecida (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). EAEC intensifica a secreção de muco na mucosa intestinal formando um denso biofilme no local. O papel da produção de muco na patogênese de EAEC não está claro, mas a formação de biofilme pode estar envolvida com o caráter persistente da colonização e da diarreia (NATARO; KAPER, 1998). As manifestações clínicas resultantes da infecção por EAEC são a diarreia aguda e persistente (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

EAEC foi inicialmente descrita em associação com diarreia aguda em crianças (NATARO et al., 1987). A associação entre EAEC e diarreia aguda em crianças tem sido evidenciada, tanto em países em desenvolvimento (SCALETSKY et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002; NGUYEN et al., 2005; REGUA-MANGIA et al., 2004; BUERIS et al., 2007) como desenvolvidos (ROBINS-BROWNE et al., 2004; COHEN et al., 2005; NATARO et al., 2006). Nos EUA, EAEC é um dos patógenos mais comumente identificados em casos de diarreia (FLORES; OKHUYSEN, 2009).

Outros estudos epidemiológicos realizados também em países em desenvolvimento associaram fortemente EAEC à diarreia persistente, ou seja, com duração maior que 14 dias. No Brasil, estudos realizados entre as décadas de 80 e 90, demonstraram a associação entre EAEC e a diarreia persistente na cidade de Fortaleza, onde EAEC esteve presente em mais de 68% dos casos (PINTO et al., 1983; LIMA et al., 1992; FANG et al., 1995). Steiner et al. (1998), nessa mesma cidade, demonstraram a relação entre colonização por EAEC, independente da sintomatologia de diarreia, e o déficit de desenvolvimento (peso/altura) de crianças de baixo nível socioeconômico.

EAEC também têm sido isoladas de fezes de pacientes imunocomprometidos, como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (GASSAMA-SOW, et al., 2004; SAMIE et al., 2008; MEDINA, et al., 2010), associada à diarreia do viajante em adultos que retornaram de viagens oriundas de países subdesenvolvidos (HUANG, et al., 2006; MOHAMED et al., 2007; PASCHKE, et al., 2011) e presente em surtos de diarreia associados pela ingestão de alimentos e água contaminadas (NATARO, et al., 2006; HARADA et al., 2007; ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012).

O número crescente de estudos epidemiológicos associando a EAEC com diarreia em países em desenvolvimento sugere que este microrganismo está se tornando um importante agente infeccioso (LIMA, 2013), inclusive no Brasil onde em estudos sobre a etiologia da diarreia aguda tem sido encontrado como o agente bacteriano mais frequente (RODRIGUES et al., 2002; SCALETSKY et al., 2002; REGUA-MANGIA et al., 2004; BUERIS et al., 2007).

2.2.4 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

ETEC foi descrita pela primeira vez na Índia (GORBACH et al., 1971; SACK, 1980). A patogenicidade de ETEC é resultante da produção de dois tipos de enterotoxinas: termolábil (LT) e termoestável (ST). A toxina LT é muito similar com a toxina colérica (COHEN; GIANNELLA, 1995). Cepas de ETEC podem ser identificadas pela detecção de genes responsáveis pela produção de tais toxinas, utilizando técnicas de hibridização de DNA ou PCR (SCHULTSZ et al., 1994).

Os genes *est* e *elt* codificam as toxinas ST e LT, respectivamente, e são encontrados em plasmídeos, entretanto alguns genes que codificam ST foram

encontrados em transposons (NATARO; KAPER, 1998). As cepas de ETEC produzem ST, LT ou ambas as toxinas, dependendo do plasmídeo que apresentam. A estabilidade destes plasmídeos pode variar e a consequência pode ser a perda da capacidade enterotoxigênica após algum período de estocagem, ou mesmo, após vários repiques laboratoriais (GYLES; SO; FALKOW, 1974; ORSKOV et al., 1975).

LTs de *E. coli* são toxinas oligoméricas, formadas por cinco subunidades B e uma subunidade A; e ambas atuam aumentando os níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico). Existem dois grandes grupos de LT: LT-I e LT-II. LT-I é expressa por cepas de *E. coli* patogênicas para humanos e animais. LT-II foi isolada primeiramente de cepas de *E. coli* de origem animal sendo raramente descrita em humanos. Entretanto, essa toxina não tem sido associada com doenças tanto em animais como em humanos (NATARO; KAPER, 1998).

STs são toxinas monoméricas e existem duas classes que apresentam diferenças na estrutura e no mecanismo de ação, STa (STI) e STb (STII). Os genes para ambas as classes são encontrados predominantemente em plasmídeos, mas alguns genes têm sido encontrados em transposons (NATARO; KAPER, 1998). As cepas de ETEC isoladas de humanos produzem STa e as cepas de ETEC isoladas de animais produzem predominantemente STb (BÖLIN et al., 2006).

Esse patotipo de DEC, também é conhecido como agente causador da “diarreia dos viajantes” entre adultos de países desenvolvidos visitando áreas endêmicas, onde infecções por ETEC são frequentemente assintomáticas e as condições higiênico-sanitárias são precárias, e ainda de diarreia em crianças de 1 a 5 anos de idade (NATARO; KAPER, 1998), bem como de colibacilose em animais jovens, principalmente leitões e bezerros (NAGY; FEKETE, 2005).

O desenvolvimento de diarreia por ETEC depende de dois fatores importantes: colonização do intestino delgado e produção de enterotoxina (HADAD; GYLES, 1982). As enterotoxinas produzidas causam perda de água e eletrólitos para dentro do lúmen intestinal provocando diarreia e desidratação. A colonização do intestino delgado é outro fator importante para o aparecimento da diarreia (SMITH; HUGGINS, 1978). As cepas enterotoxigênicas, além da capacidade de produzirem toxinas, precisam aderir-se à mucosa do intestino delgado e colonizá-lo para que o processo infeccioso se estabeleça. Esta adesão é mediada por fímbrias

proteicas, denominadas fatores de colonização, que estão presentes na superfície bacteriana e que reconhecem receptores específicos, localizados na superfície da célula epitelial intestinal. (GAASTRA; GRAAF, 1982). Assim, a infecção por ETEC é superficial, uma vez que são bactérias aderentes superficiais, aderem às células da mucosa do intestino delgado sem provocar qualquer alteração nas microvilosidades, não penetrando no epitélio intestinal. Por esta razão, as fezes dos pacientes afetados não apresentam leucócitos, sangue ou muco (NATARO; KAPER, 1998).

Em um estudo realizado na Nigéria, 520 amostras diarreicas de recém-nascidos e de crianças de várias faixas etárias foram avaliadas, além de 250 amostras de indivíduos aparentemente saudáveis (grupo controle). Das amostras do grupo com diarreia, 44,74% foram de DEC e destas, 21,57% eram ETEC (OKEKE, 2009). De acordo com o estudo realizado por Menezes et al. (2003) no Brasil, ETEC foi responsável por cerca de 20% dos casos de diarreia em crianças. Outro estudo realizado em Porto Velho, com 470 crianças de até 72 meses de idade, acometidas de diarreia, encontrou-se DEC em 86 crianças, ou seja, 18,2% dos casos, sendo 21 casos (4,4%) de ETEC (ORLANDI, 2006).

Diarreia por ETEC, como outras doenças diarreicas, pode ser o resultado da ingestão de alimentos e água contaminados, com uma dose infectante de aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (NATARO; KAPER, 1998). Em uma situação onde a água e condições sanitárias são inadequadas, ETEC é uma das maiores causas de doença diarreica. A transmissão de ETEC por processamento de produtos alimentícios fora de países em desenvolvimento é menos comum (QADRI et al., 2005).

2.2.5 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

EIEC é a terceira classe de *E. coli* associada com diarreia, semelhante a *Shigella spp.* na patogenia e nos antígenos somáticos (DUPONT et al., 1971). As cepas de EIEC são frequentemente não móveis, não tem produção de gás e não descarboxila a lisina (TOLEDO; TRABULSI, 1983).

EIEC pode causar uma colite inflamatória invasiva, e ocasionalmente disenteria, mas na maioria dos casos causam diarreia aquosa, como as outras DEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A infecção intestinal causada por EIEC é estritamente relacionada à infecção por *Shigella dysenteriae* e são mais frequentes

em crianças maiores de dois anos de idade e no adulto (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). A transmissão é por contato pessoal ou pela ingestão de alimentos contaminados (GORDILLO et al., 1992; HARRIS et al., 1985).

Como algumas espécies de *Shigella*, estas cepas invasivas apresentam plasmídeos de alto peso molecular de 140 MDa, sendo que o gene *ipaH* esta inserido dentro deste plasmídeo, determinando o mecanismo de invasão (HARRIS et al., 1982; HALE et al., 1983; HART; BATT; SAUNDERS, 1993).

A patogênese de EIEC/*Shigella* compreende penetração nas células epiteliais (células M), seguido de lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento através do citoplasma e invasão basolateral para as células adjacentes (NATARO; KAPER, 1998; PARSOT, 2005). A invasão da mucosa por EIEC provoca intensa reação inflamatória tecidual e disentérica (LEVINE, 1987). Estudos com voluntários demonstraram que são necessárias 10^6 UFC para provocar doença em adultos saudáveis (NATARO; KAPER, 1998).

Este patotipo é pouco isolado em relação aos outros descritos anteriormente. Estudos no Brasil descreveram a presença de EIEC em 1,4% dos isolados em Porto Velho e João Pessoa e menos de 1% em Salvador e Rio de Janeiro (REGUA-MANGIA et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; ORLANDI et al., 2006; MORENO et al., 2010).

3 REFERÊNCIAS

- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*(+) EAF negative *stx*(-) genetic profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 357-365, ago. 2009.
- AFSET, J. E. et al. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 1137-1144, nov. 2004.
- ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106, p. 16-18, nov. 2014.
- ANDRADE, J. A. B. de; HAAPALAINEN, E. F.; FAGUNDES-NETO, U. *Escherichia coli* enteroagregativa como agente provocador de diarreia persistente: modelo experimental utilizando microscopia óptica de luz. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 29, n. 1, p. 60-66, jun. 2011.
- ARAUJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, out. 2007.
- BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. P. Colibacillosis. In: SAIF, Y. (ed.). **Diseases of Poultry**. 12. ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 691–737.
- BARRETO, M. L.; CARMO, E. H. Padrões de adoecimento e de morte da população brasileira: os renovados desafios para o Sistema Único de Saúde. **Ciência ; Saúde Coletiva**, v. 12, suppl. 0, p. 1179-1790, nov. 2007 .
- BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. 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. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4302-4311, ago. 2002.
- BLANCO, M. et al. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **International Microbiology**, v. 9, n. 20, p.103–110, jun. 2006.
- BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAFfamily. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3281-3292, jul. 2008.
- BÖLIN, I. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3872-3877, nov. 2006.
- Brasil. Ministério da Saúde (MS). Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Sistema de Informação de Mortalidade. Mortalidade – Brasil. Óbito por residência por Capítulo CID 10 segundo região. Brasília: MS; 2011.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neopolitanum* from summer diarrhoea of infants. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 239–247, mar. 1945.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 836-844, nov. 2007.

BUERIS, Vanessa. **Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica que apresenta o padrão de adesão localizada-like com a célula epitelial in vitro**. 2008. 131 fls. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BÜHLER, H. F. et al. Análise espacial de indicadores integrados determinantes da mortalidade por diarreia aguda em crianças menores de 1 ano em regiões geográficas. **Ciências ; Saúde Coletiva**, v. 19, n. 10, p. 4131-4140, out. 2014.

CALDORIN, M. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 10, n. 110, p. 4-20, fev. 2013.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-552, out. 2004.

CAPRIOLI, A. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 289-311, maio. 2005.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; GARCIA-ESTRADA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 41, n.5, p. 2138-2140, maio 2003.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, v. 1, p. 83-98, jan. 2005.

CHENG, A. C.; MCDONALD, J. R., THIELMAN, N. M. Infectious Diarrhea in Developed and Developing Countries. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, n. 9, p. 757-773, out. 2005.

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

COHEN, M. B. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **Journal of Pediatrics**, v. 146, n. 1, p. 54-61, jan. 2005.

COHEN, M. B.; GIANNELLA, R. A. **Enterotoxigenic *Escherichia coli***. In: Blaser, M. J.; Smith, P. D., et al. (Ed.). *Gastrointestinal tract infections* New York: Raven Press, p.691-707, 1995.

COLLARES, G. B. **Pesquisa de *Escherichia coli* enteropatogênica em crianças com diarreia aguda em Belo Horizonte/MG**. 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COOKSON, A. L. et al. Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6360-6369, ago. 2007.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, jan. 2010.

DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the *AggR* regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n.5, p. 1267-1282, set. 2006.

DUPONT, H. L. et al. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **The New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 1, p. 1-9, jul. 1971.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 281-298, dez. 2012.

FAGUNDES-NETO, U. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in infants: clinical aspects and small bowel morphological alterations. **Review Microbiology**, v. 27, suppl. 1, p. 117-119, dez. 1996.

FANG, G. D. et al. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 21, n.2, p. 137-144, ago. 1995.

FLORES, J.; OKHUYSEN, P. C. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, n. 1, p. 8-11, jan. 2009.

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

FÜRST, S. et al. Identification and characterization of *Escherichia coli* strains O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shiga toxin genes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 383-386, abr. 2000.

GAASTRA, W.; GRAAF, F. K. Host-specific fimbrial adhesions of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiological Review**, v. 46, n. 2, p. 129-161, jun. 1982.

GASSAMA-SOW, A. et al. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n.1, p. 75-78, jan. 2004.

GOBIUS, K. S.; HIGGS, G. M.; DESMARCHELIER, P. M. Presence of activatable Shiga toxin genotype (*stx2d*) in shiga toxigenic *Escherichia coli* from livestock sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3777-3783, ago. 2003.

GORBACH, S. L. et al. Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal microflora. **Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 4, p. 881-889, abr. 1971.

GORDILLO, M. E. et al. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 889-893, abr. 1992.

GOULD, L. H. et al. Recommendations for diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. **Recommendations and Reports**, v. 58, n. 12, p. 1-14, out. 2009.

GUASTALLI, Elisabete Aparecida Lopes. **Estudo dos fatores de virulência, sorogrupos, patogenicidade e susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de pintainhas de reposição de postura**. 2010. 75 fls. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 13, p. 45-62, mar. 2007.

GYLES, C. L.; SO, M.; FALKOW, S. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 130, n. 1, jul. p. 40-49, 1974.

HADAD, J. J.; GYLES, C. L. Scanning and transmission electron microscopic study of the small intestine of colostrums-fed calves infected with selected strains of *Escherichia coli*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n.1, p. 41-49, jan. 1982.

HALE, T. L. et al. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 40, n. 1, p. 340-350, abr. 1983.

HARADA, T. et al. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 60, n. 2-3, p. 154-155, maio, 2007.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letter**, v. 254, n. 1, p.12-18, jan. 2006.

HARRIS, J. R. et al. High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 3, p. 1295-1298, set. 1982.

- HARRIS, J. R. et al. Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. **American Journal of Epidemiology**, v. 122, n. 2, p. 245-252, ago. 1985.
- HART, C. A.; BATT, R. M.; SAUNDERS, J. R. Diarrhoea caused by *Escherichia coli*. **Annals of Tropical Pediatrics**, v. 13, n. 2, p. 121-131, nov. 1993.
- HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, n. 2, 137-149, ago. 2009.
- HORCAJO, P. et al. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 2012, p. 341-348, ago. 2011.
- HUANG, D. B. et al. Review of emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n.10, p. 1303-1311, out. 2006.
- HUANG, D. B.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 5, p. 506-508, nov. 2003.
- JENKINS, C. et al. Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 1493-1497, nov. 2006.
- JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesion on tissue culture cells. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, out. 1990.
- KAPER, J. B. Defining EPEC. **Review Microbiology**, v. 27, suppl. 1, p. 130-133, dez. 1996.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, fev. 2004.
- KENNY, B. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511-520, nov. 1997.
- KNUTTON, S. et al. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 4, p. 1290-1298, abr. 1989.
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 775-779, dez. 1977.

LAW, D.; KELLY, J. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga like toxin producing *E. coli* serogroups. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 700-702, fev. 1995.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 3, p. 377-389, mar. 1987.

LEVINE, M. M. et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **The Lancet**, v. 311, n. 8074, p. 1119-1122, maio. 1978.

LIMA, A. A. et al. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatrica**, v. 81, suppl. 381, p. 39-44, set. 1992.

LIMA, I. F. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulencerelated genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 683-693, maio 2013.

McDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, fev. 1995.

MEDINA, A. M. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus (HIV) pediatric patients in Lima, Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p.158-163, jul. 2010.

MENEZES, C. A. et al. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Brazilian Journal of Microbiology suppl**, v. 34, suppl. 1, p. 11-13, nov. 2003.

MOHAMED, J. A. et al. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in 89 isolates from travelers to developing countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 121-126, jan. 2007.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340-1351, set. 1983.

MORA, A. et al. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin) producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v. 156, n.7, p. 793-806, abr. 2005.

MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 1, p. 50-57, jan. 2008.

MORENO, A. C. R. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious**

Disease, v. 66, n. 1, p. 50-57, jan. 2010.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 443-454, out. 2005.

NATARO, J. P. et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2297-2304, jun. 1992.

NATARO, J. P. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 4, p. 402-407, ago. 2006.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829-831, set. 1987.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1 p. 142-201, jan. 1998.

NGUYEN, R. N. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerging Infectious Disease**, v. 12, n. 4, p. 597-603, abr. 2006.

NGUYEN, T. V. et al. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n. 2, p. 755-760, fev. 2005.

O'RYAN, M.; PRADO V.; PICKERING, L. K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p.125-136, abr. 2005.

OKEKE, I. N. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 11, p. 817-842, nov. 2009.

OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde). Rede Interagencial de Informações para a Saúde. Indicadores Básicos de saúde no Brasil: conceitos e aplicações. Brasília. 2009.

ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 507-517, abr. 2006.

ORSKOV, I. et al. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible escherichia coli K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 83, n. 1, p. 31-36, fev. 1975.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letter**, v. 252, n. 1, p. 11-18, nov. 2005.

PASCHKE, C. et al. Controlled study on enteropathogens in travelers returning from the tropics with and without diarrhea. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 8, p. 1194-1200, ago. 2011.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.

PAULA, Cheila Minéia Daniel de. **Avaliação da resistência térmica, ácida e a desinfetantes de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 isoladas no Sul do Brasil**. 2014. 136 fls. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PINTO, M. et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Cell**, v. 47, p. 323–330, nov. 1983.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-7, jan. 2012.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 3, p. 465-483, jul. 2005.

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. **Journal of Infection**, v. 48, n. 2, p. 161-167, fev. 2004.

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, mar. 1983.

RIVAS, M. et al. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 66, n. 3, p. 27-32, nov. 2006.

RIVAS, M. et al. Intestinal bleeding and occlusion associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O127: H21. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 60, n. 2, p. 249-252, nov. 2000.

ROBINS-BROWNE, R. M. et al. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1797-1805, out. 2004.

RODRIGUES, J. et al. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 11, p. 1311-1318, ago. 2002.

RODRIGUES, J. et al. Reduced etiological role for *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 398-400, jan. 2004.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, mar. 2000.

RÜTTLER, M. E. et al. Evaluation of a multiplex PCR method to detect Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocell**, v. 30, n. 2, p. 301-308, ago. 2006.

SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: identification and characterization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 142, n. 2, p. 279-286, ago. 1980.

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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 1, p. 142-150, jul. 2007.

SCALETSKY, I. C. A. et al. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3756-3759, nov. 2009.

SCALETSKY, I. C. A. et al. Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 36, n. 1, p. 54-60, jan. 1999.

SCALETSKY, I. C. A. et al. EPEC adherence to Hep-2 cells. **Review Microbiology**, v. 27, suppl. 1, p. 58-62, dez. 1996.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 2, p. 534-536, ago. 1984.

SCALETSKY, I. C. et al. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 8, p. 855-858, ago. 2002.

SCHULTSZ, C. et al. Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2393-2397, out. 1994.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. The influence of plasmid-determined and other characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 11, n.4, p. 471-492, nov. 1978.

SOUZA, R. L. de et al. Hemolytic Uremic Syndrome in Pediatric Intensive Care Units in São Paulo, Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, suppl. 1, 76-82, jul. 2011.

STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p. 88-96, jan. 1998.

SUSSMAN, Max. *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 640p.

TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n.6, p. 320-329, jun. 2010.

TOLEDO, M. R.; TRABULSI, L. R. Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sereny test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 419-421, mar. 1983.

TORRES, A. G.; ARENAS-HERNANDEZ, M.; MARTINEZ-LAGUNA Y. Overview of *Escherichia coli*. In Torres, A. G. (ed.). **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, 1 ed. University of Texas, USA: Bentham Science Publishers, 2010. p. 1-7.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-513, maio. 2002.

WALKER, C. L; BLACK, R. E. Diarrhoea morbidity and mortality in older children, adolescents, and adults. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 9, p. 1215-1226, set. 2010.

WERBER, D. et al. Strong association between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx2* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroups O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. p. 726-730, dez. 2003.

WHO (World Health Organization). Programme for control of diarrheal diseases (CDD/83.3 Rev 1). Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. Geneva, 1987.

WHO (World Health Organization); UNICEF (The United Nations Children's Fund). Ending Preventable Child Deaths from Pneumonia and Diarrhoea by 2025/The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPD). 2013.
Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79200/1/9789241505239_eng.pdf?ua=1>.
Acesso em: 15 fev. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Improving diarrhoea estimates. Child and Adolescent Health and Development, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a prevalência de DEC, através da caracterização genotípica e fenotípica de fatores de virulência de cepas de *E. coli*, isoladas de fezes diarreicas de crianças entre 0 e 12 anos de pacientes do Hospital Universitário de Londrina, no Paraná, durante o período de maio de 2013 a novembro de 2014.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar amostras de *E. coli* em fezes de crianças com diarreia;
- Determinar a presença de fatores de virulência de DEC, através da detecção dos genes marcadores de virulência pela técnica da PCR;
- Determinar os subtipos dos genes *stx*₂;
- Analisar a propriedade fenotípica de adesão a células epiteliais HEp-2.

1 **5 TRABALHO CIENTÍFICO**

2

3 *Artigo submetido à revista *FEMS Microbiology Letters*.

4

5 **Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with diarrhea in the**
6 **North of Paraná State, Brazil**

7

8 **Running title: Diarrheagenic *Escherichia coli* from children with diarrhea**

9

10 Angélica Marim Lopes¹, Tatiane das Neves Burgos¹, Paulo Alfonso Schuroff¹, Nicole
11 Ribeiro de Lima¹, Eliana Carolina Vespero², Sérgio Paulo Dejato da Rocha¹, Renata
12 Katsuko Takayama Kobayashi¹, Gerson Nakazato¹, Armando Navarro³, Jacinta
13 Sanchez Pelayo^{1*}.

14

15 ¹Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina,
16 Londrina, Paraná, Brazil.

17 ²Departamento de Patologia Clínica, Análises Clínicas e Toxicologia, Centro de Ciências da Saúde,
18 Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

19 ³Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,
20 Ciudad Universitaria, D. F. 04510, México.

21 *Correspondência: Fone: +55 (43) 3371-4494;

22 E-mail: jspelayo@gmail.com

23

24 **Abstract**

25

26 Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) are important enteric pathogens that cause
27 gastrointestinal diseases, particularly among children in developing countries,

28 resulting in significant morbidity and mortality. A total of 426 *E. coli* isolates were
29 studied from 71 children with diarrhea between zero and 12 years old of University
30 Hospital, in the North of Paraná State, Brazil. Virulence genes of the five DEC
31 pathotypes investigated in this study were determined using the technique of
32 Polymerase Chain Reaction. The HEp-2 cell adherence assay was performed on all
33 samples analyzed for phenotypic characterization. It was found among the samples
34 studied 62 (87.4%) categorized as DEC, with 6 (8.5%) Enteropathogenic *E. coli*
35 (EPEC), all of atypical EPEC (aEPEC) subgroup, 3 (4.2%) of Shiga toxin-producing
36 *E. coli* (STEC), 6 (8.5%) of typical Enteroaggregative *E. coli* (tEAEC) and 47 (66.2%)
37 of atypical EAEC (aEAEC). However, genes of other pathotypes studied in this work,
38 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) were not found.
39 Thus, it was demonstrated that DEC are important pathogens in the etiology of
40 childhood diarrhea and epidemiological studies may help minimize the dangers of
41 these pathogens against public health.

42

43 **Key words:** *Escherichia coli*, diarrhea, children, genes, pathotypes, pathogens.

44

45 **Introduction**

46

47 During the twentieth century, Brazil went ample changes in its population
48 structure and its morbidity and mortality patterns. However, infectious diseases are
49 still important morbidity problems, especially in children (Barreto; Carmo, 2007). Amid
50 these diseases there are the intestinal infections and *Escherichia coli* is the most
51 common etiological agent among the bacterial pathogens (O'Ryan; Prado; Pickering,
52 2005).

53 Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) are related to be a common cause of
54 childhood diarrhea in developing countries (Presterl *et al.*, 2003) with a higher
55 incidence in children younger than five years (Kosek; Bern; Guerrant, 2003). DEC
56 are traditionally categorized into six pathotypes based on their pathogenicity profiles
57 (virulence factors, clinical disease and phylogenetic profile): Enteropathogenic *E. coli*
58 (EPEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC),
59 Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and Diffusely
60 Adherent *E. coli* (DAEC) (Nataro; Kaper, 1998). Besides, EPEC and EAEC were
61 subdivided into typical and atypical and Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) have
62 become a subcategory of STEC (Kaper; Nataro; Mobley, 2004). Nevertheless two
63 further pathotypes have recently emerged; Adherent Invasive *E. coli* (AIEC) which is
64 thought to be associated with Crohn disease but does not cause diarrheagenic
65 infection (Croxen; Finlay, 2010) and the Shiga Toxin producing *Enterobacteriaceae* *E.*
66 *coli* (STEAEC) responsible for the 2011 Germany *E. coli* outbreak (Clements *et al.*,
67 2012).

68 The different virulence groups of DEC can be identified by culture, serotyping,
69 biochemical reactions, and other phenotypic assays, as well molecular methods
70 (Nataro; Kaper, 1998). So, the recent availability of the full genome sequences of the
71 DEC has allowed the identification of genetic markers that can be used to determine
72 these pathotypes (Croxen; Finlay, 2010). Polymerase chain reaction (PCR) is a
73 commonly used method that gives rapid, reliable results, and it has proved to be
74 more sensitive and specific than most conventional techniques (Bueris *et al.*, 2007,
75 Rajendran *et al.*, 2010).

76 Various PCR methods, with both single and multiple target genes, have been
77 reported to identify the different DEC pathotypes (Rajendran *et al.*, 2010). EPEC is

78 characterized by the presence of intimin (*eae*) gene causing intestinal lesions, known
79 as attaching and effacing (AE) lesions and the bundle-forming pili (*bfp*) gene (Jerse
80 *et al.*, 1990). Typical EPEC (tEPEC) is characterized by the presence of both *eae*
81 and *bfp* genes, while atypical EPEC (aEPEC) possess the *eae* gene alone. STEC is
82 typically characterized by the presence of two toxin genes, *stx1* and/or *stx2*. EHEC,
83 an subcategory of STEC, in addition to the presence *stx1* and/or *stx2* genes, it has
84 the ability to cause the AE lesion by the presence of the intimin (*eae*) gene. ETEC
85 strains characterize by the presence of one or both genes encoding ST (*est*) and LT
86 (*elt*) enterotoxins (Nataro; Kaper, 1998). EIEC is determined by the presence of a
87 140-MDa virulence plasmid (*pInV*), which encodes a number of genes for invasion
88 that includes *ipah* gene. (Berlutti *et al.*, 1998). The gold standard assay to detect
89 EAEC is the observation of the aggregative adherence pattern (AA) in cultured
90 epithelial cells, usually HEp-2 cells (Nataro *et al.*, 1987). However, pathogenesis and
91 molecular studies suggest *aaiC*, *aaiA* and *aaiG* virulence genes to detect atypical
92 EAEC (aEAEC) (Dudley *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2013; Andrade; Gomes; Elias,
93 2014) and *aggR* gene in the identification of typical EAEC (tEAEC) (Dudley *et al.*,
94 2006).

95 So, in this study, we determined the prevalence of DEC strains in children with
96 diarrhea attending the emergency room of University Hospital of Londrina, in the
97 North of Paraná State, Brazil during 2013 and 2014. We used specific primer pairs
98 for EPEC, STEC, ETEC and EIEC virulence genes to detect these pathotypes by
99 PCR technique. HEp-2 cell adherence assay was used to detect EAEC. Samples
100 positive for this pathotype were further analysed for the presence of virulence genes.

101

102 **Materials and methods**

103

104 **Fecal samples and bacterial strains.** A total of 426 *Escherichia coli* isolates were
105 examined in this study. These strains were isolated from 71 children with symptoms
106 of gastrointestinal disorders attending the emergency room of University Hospital of
107 Londrina of the State University of Londrina (UEL), in the North of Paraná State,
108 Brazil between May 2013 and November 2014. For each one of the samples
109 collected a single rectal swab was used. Samples were transported to the laboratory
110 in Cary-Blair medium (Difco®) and were cultured using MacConkey Agar (Difco®)
111 plates which were then incubated at 37 °C for 24 h. These procedures were
112 approved by Committees for Ethics in Research involving Human Subjects from UEL
113 (process number: 32838.2012.68). Five to six colonies from each plate were selected
114 and examined using biochemical assays (Ewing, 1986; Toledo *et al.*, 1982a, 1982b)
115 to confirm the presence of *E. coli*. The samples were stored in Brain Heart Infusion
116 (BHI) (Difco®) plus 20% glycerol (Sigma®) media at -80 °C.

117

118 **Bacterial DNA isolation.** Bacterial DNA was obtained by boiling method. Briefly, the
119 isolates were cultivated on Luria-Bertani (LB) Agar (Difco®) overnight at 37 °C. A
120 loopful for each bacterial growth was resuspended in 300 µL of sterile ultrapure
121 water, boiled at 100 °C for 10 min and centrifuged to 10 000 x *g* for 5 min. For
122 positive and negative controls in the PCR and adherence assays the following
123 reference strains used: E2348/69 (O127:H6, *eae*, *bfpA*, localized adherence),
124 DEPEC 008 (O98:H28, *eae*, localized adherence like), EDL 933 (O157:H7, *eae*, *stx1*,
125 *stx2*, *stx2a*, *ehxA*), EAEC 042 (*aggR*, *aatA*, *aaiC*, *aaiA*, aggregative adherence),
126 EIEC FBC124-13 (O124:NM, *ipaH*), ETEC H10407 (O78:K80:H11, *elt*, *est*), and *E.*
127 *coli* K-12 (DH5α, negative control).

128

129 **Detection of DEC by Polymerase Chain Reaction (PCR).** The supernatants were
130 utilized as templates in multiplex PCR for detection of the Shiga toxin (*stx1* and *stx2*)
131 and intimin (*eae*) genes, according to Paton and Paton (1998). Strains positive for
132 *eae* were analysed further to identify the bundle-forming pili gene (*bfpA*) (Gunzburg;
133 Tornieporth; Riley, 1995) and strains positive for *stx1* and *stx2* were investigated for
134 the presence of gene encoding enterohemolysin (*ehxA*) (Paton; Paton, 1998). The
135 *stx2* subtyping was carried out by PCR using primers for *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* (Wang *et al.*
136 *al.*, 2002) and *stx2d* genes (Zheng *et al.*, 2008). The identification of EAEC was
137 performed by gene amplification of *aaiC* (Lima *et al.*, 2013) and *aaiA* (Dudley *et al.*,
138 2006) (chromosomal genes); *aatA* (Schmidt *et al.*, 1995) and *aggR* (Boisen *et al.*
139 2012) (plasmid genes). According to Aranda *et al.* (2007), ETEC was identified by *est*
140 e *elt* genes and EIEC detected by *ipaH* gene. Table 1 shows the primer sequences
141 and sizes of amplified DNA fragments for all sequences studied. Amplification
142 reactions were performed on GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied
143 Biosystems, USA), with mixtures of 25 µL containing 2 µL of bacterial lysates, 200
144 µM dNTPs (Invitrogen®), 1X PCR buffer, 2.5 µM MgCl₂, 20 pmol of each primer
145 (Invitrogen®) and 1 U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen®). PCR products were
146 analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis with SYBR Safe™ DNA Gel Stain
147 (Invitrogen®) and visualized under ultraviolet light (Vilbert Loumart, France) ECX-
148 20.M.

149

150 **HEp-2 cell adherence assay.** Adherence capacity of all isolates to HEp-2 (human
151 laryngeal epithelial carcinoma) cells was tested according to Cravioto *et al.* (1979)
152 after 6 h of bacteria–cell interaction.

153

154 **Cytotoxicity assay on Vero cells.** The cytotoxicity assay on Vero (African green
155 monkey kidney) cells was carried out according to Beutin *et al.* (2002). STEC
156 supernatants were prepared as described previously (Rocha; Piazza, 2007), and
157 1:10 dilutions were tested in duplicates on Vero cells. Supernatants of *E. coli*
158 O157:H7 (EDL933) and K-12 (DH5 α) strains were used as positive and negative
159 controls, respectively. After 72 h-exposure to STEC supernatants, cellular metabolic
160 activity was determined using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
161 diphenyltetrazolium bromide; Sigma–Aldrich®) assay, according to manufacturer’s
162 instructions. The level of cytotoxicity was calculated using the following formula:
163 $(\text{absorbance of the sample} - \text{absorbance of the negative control}) / (\text{absorbance of the}$
164 $\text{positive control} - \text{absorbance of the negative control}) \times 100.$

165

166 **Serotyping.** Determination of O and H antigens was carried out as previously
167 described (Guinée *et al.*, 1981), employing all available O (O1–O185) and H (H1–
168 H56) antisera. All antisera were absorbed with the corresponding crossreacting
169 antigens to remove the nonspecific agglutinins. The O and H antisera were produced
170 in the, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México.
171 Isolates that did not react with O antisera were considered as non-typeable (ONT)
172 and those nonmotile were H–.

173

174 **Results and Discussion**

175

176 *Escherichia coli* is the predominant nonpathogenic normal microbiota of the
177 human intestine. Some *E. coli* strains, however, have developed the ability to cause

178 disease of the gastrointestinal, urinary, or central nervous system in even the most
179 robust human hosts. DEC are responsible for human disease worldwide (Nataro;
180 Kaper, 1998). In this study, a total of 71 children samples with diarrhea were studied
181 and 87,4% (62 samples) of DEC was isolated. These results were considered in
182 combination of PCR with the adherence patterns on HEp-2 cells, where AA was the
183 gold standard to define EAEC (Gomes *et al.*, 1998). A summary of the genotypic and
184 phenotypic characteristics of these samples is shown in Table 2.

185 The majority of the positive samples (53 samples, 74,7%) belonged to the
186 EAEC pathotype, being 6 (8.5%) typical and 47 (66.2%) atypical. EAEC samples
187 were considered as tEAEC because they were AA pattern and PCR positive for *aggR*
188 gene, while the others samples of this pathotype were considered as aEAEC
189 because they presented the AA pattern, but were not detected *aggR* gene by the
190 PCR. The diagnostic genes *aaiC*, *aaiA* e *aatA* were also studied in aEAEC samples
191 and different patterns were observed: only positive for *aaiC*, only positive for *aaiA*
192 and positive for both *aaiC* and *aatA*. In this samples *aaiC* gene was detected in one
193 (1.4%), *aaiA* gene has also been detected in one (1.4%) sample, as well as one
194 (1.4%) sample was positive for both *aaiC* and *aatA* genes. The others aEAEC
195 samples (62%) were not detected for additional virulence genes. tEAEC samples
196 were also analysed for these genes and was observed in three (4.25%) of six the
197 presence of *aggR*, *aatA* and *aaiA* genes while in the other three (4.25%) were
198 detected only *aggR* and *aatA* genes.

199 In this study, these results showed that diagnostic genes may not be good
200 markers to diagnose EAEC samples. So, the HEp-2 adhesion assay was used as the
201 gold standard to identify this pathotype (Nataro; Kaper, 1998). In study performed by
202 Andrade, Gomes e Elias (2014) showed that the sensitive and specific diagnosis of

203 EAEC should include the detection of AA-positive strains, regardless of the presence
204 of aggR, however, the report described PCR as an excellent tool for the diagnosis of
205 both typical and atypical EAEC strains.

206 Besides, EAEC have been frequently identified in children with diarrhea in
207 studies conducted in Brazil and in other countries (Nataro; Kaper, 1998; Scaletsky *et al.*
208 *et al.* 2002; Zamboni *et al.* 2004; Regua-Mangia *et al.* 2004; Bueris *et al.* 2007), which
209 is in agreement with the results reported in this study. These strains have also been
210 associated with traveler's diarrhea in both developing and industrialized countries,
211 and have been isolated in immunocompromised patients (Medina *et al.* 2010;
212 Paschke *et al.* 2011).

213 The most frequently isolated was EAEC (74.7%), followed by aEPEC (8.5%)
214 that had the *eae* gene alone. In contrast, the characteristic genetic profile of tEPEC
215 was not found in this study. The isolation of only aEPEC strains, in the present study,
216 confirm a recent trend that has been observed in studies conducted in several
217 Brazilian states (Rodrigues *et al.* 2002; Regua-Mangia *et al.*, 2004; Franzolin *et al.*,
218 2005; Araujo *et al.*, 2007; Bueris *et al.* 2007), showing a drastic decline in the
219 frequency of tEPEC with the frequency of aEPEC strains on the rise. In contrast, up
220 to the 1990s, tEPEC was the main cause of acute diarrhea in children younger than
221 one year old (Trabulsi *et al.* 2002). According to study conducted by Kobayashi *et al.*
222 (2000) was found that tEPEC was more prevalent than aEPEC, in samples of
223 children under two years old obtained from the same University Hospital in Londrina,
224 Paraná during February 1995 to September 1996.

225 The *stx* genes was not detected in any of the six samples identified as *eae*-
226 positive. STEC was detected in three samples (4.2%). Only one (1.4%) sample
227 presented the *stx1* gene while two (2.8%) possessed the *stx2* gene. Stx subtypes

228 associated with severe human illness as Stx2a, Stx2b ,Stx2c and Stx2d (Beutin *et*
229 *al.*, 2004; Stritt *et al.*, 2012), were not identified. None of the samples have been
230 verified to the ability to produce enterohemolysin encoded by the gene *ehxA*. All
231 STEC supernatants produced cytotoxic effect on Vero cells, and showed a
232 cytotoxicity above 25-30% as determined by MTT assay.

233 In Brazil, infections due to STEC have been identified in sporadic cases of
234 non-bloody diarrhea, particularly in young children (Guth *et al.*, 2005; Bastos *et al.*,
235 2006), which is in agreement with the results found in study. Until now, were
236 characterized three strains of *E. coli* O157: H7 isolated from stool of patients in São
237 Paulo, Instituto Adolfo Lutz, Brazil (Iriño *et al.*, 2002).

238 The serotypes isolated from aEPEC and STEC in this study are not commonly
239 found in other reports (Rodriguez-Angeles, 2002; Franzolin *et al.*, 2005; Caldorin *et*
240 *al.*, 2013). Serotypes found to aEPEC were O1:H18, O51:H40, O56:H6 and
241 O166:H21 e para STEC were ONT:H4, O153:H18 and O86:H18 (Table 2). Two new
242 serotypes not previously reported in STEC strains of sheep stools (O75:H14 and
243 O169:H7) were found in study conducted by Martins *et al.* (2015). The variability of
244 serotypes and the increased presence of O antigen non typeable (ONT) suggest that
245 new serotypes in children may cause disease.

246 Of all the samples analysed the presence of one or both genes encoding ST
247 (*est*) and LT (*elt*) enterotoxins were not found to characterize ETEC. In contrast,
248 according to the study by Menezes *et al.* (2003) in Brazil, ETEC was responsible for
249 about 20% of cases of diarrhea in children. Another study conducted in Porto Velho
250 from 470 children until 72 months of age, with diarrhea, was met DEC in 86 children
251 (18.2% of cases), with 21 cases (4.4%) ETEC-positive (Orlandi, 2006).

252 Also, the presence of *ipaH* gene to identify EIEC was not detected in any of

253 the studied samples. Studies in Brazil described the presence of EIEC in 1.4% of the
254 isolates in Porto Velho and João Pessoa and less than 1% in Salvador and Rio de
255 Janeiro (Regua-Mangia *et al.*, 2004; Franzolin *et al.*, 2005;. Orlandi *et al.*, 2006;
256 Moreno *et al.*, 2010).

257 In conclusion, this study has demonstrated that the DEC are still important
258 pathogens in the etiology of childhood diarrhea and epidemiological studies may help
259 minimize the possible dangers of these pathogens against public health.

260

261 **Acknowledgements**

262

263 We thank the Araucária Foundation – Paraná State, and the Coordination of
264 Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), who enabled the execution of
265 this study. Virology Laboratory of UEL for providing cells culture. The authors also
266 thank the University Hospital of UEL for providing fecal samples for our research.

267

268 **References**

269

270 Andrade FB, Gomes TAT, Elias WP. A sensitive and specific molecular tool for
271 detection of both typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J*
272 *Microbiol Method* 2014;**106**:16-18.

273 Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for
274 diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and Shigella spp. *J Clin*
275 *Microbiol* 2004;**42**:5849-5853.

276 Aranda KR, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U *et al.* Single multiplex assay to identify
277 simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic,

- 278 enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian
279 children. *FEMS Microbiol Lett* 2007;**267**:145-150.
- 280 Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR *et al.* Typical enteroaggregative and atypical
281 enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-
282 associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol* 2007;**45**:3396-
283 3999.
- 284 Barreto MI, Carmo EH. Patterns of death and disease in the Brazilian population:
285 renewed challenges for the National Health System (SUS). *Ciênc Saúde Coletiva*
286 2007;**12**:1179-1190.
- 287 Bastos FC, Vaz TM, Irino K *et al.* Phenotypic characteristics, virulence profile and
288 genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in
289 Brazil and other Latin American countries. *FEMS Microbiol Lett* 2006;**265**:89-97.
- 290 Berlutti F, Casalino M, Zagaglia C, *et al.* Expression of the virulence plasmid-carried
291 apyrase gene (apy) of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* is
292 under the control of H-NS and the VirF and VirB regulatory cascade. *Infect Immun*
293 1998;**6**:4957–4964.
- 294 Beutin L, Krause G, Zimmermann S *et al.* Characterization of Shiga toxin-producing
295 *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year
296 period. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:1099–1108.
- 297 Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Evaluation of the VTEC-Screen Seiken test for
298 detection of different types of Shiga toxin (Verotoxin)- producing *Escherichia coli*
299 (STEC) in human samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;**42**:1–8.
- 300 Boisen N, Scheutz F, Rasko DA *et al.* Genomic characterization of enteroaggregative
301 *Escherichia coli* from children in Mali. *J Infect Dis* 2012;**205**:431–444.
- 302 Bouzari S, Jafari A, Zarepour M. Distribution of virulence related genes among

- 303 enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and
304 hybridization. *Infect Genet Evol* 2005;**5**:79–83.
- 305 Bueris V, Sircili MP, Taddei CR *et al.* Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from
306 children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo*
307 *Cruz* 2007;**102**:836-844.
- 308 Caldorin, M, Almeida, IAZC, Peresi, JTM *et al.* Ocorrência de *Escherichia coli*
309 produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública.
310 Boletim Epidemiológico Paulista, v. 10, n. 110, p. 4-20, fev. 2013.
- 311 Clements A, Young JC, Constantinou N *et al.* Infection strategies of enteric
312 pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 2012;**3**:71-87.
- 313 Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM *et al.* An adhesive factor found in strains of
314 *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes.
315 *Curr Microbiol* 1979;**3**:95-99.
- 316 Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat*
317 *Rev Microbiol* 2010;**8**:26-38.
- 318 Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J *et al.* Proteomic and microarray characterization
319 of the *AggR* regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in Enteroaggregative
320 *Escherichia coli*. *Molecul Microbiol* 2006;**61**:1267-1282.
- 321 Ewing WH, 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier
322 Science Publishing Company, New York .
- 323 Franzolin MR, Alves RCB, Keller R, *et al.* Prevalence of diarrheagenic *Escherichia*
324 *coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*
325 2005;**100**:359-363.
- 326 Gomes TA, Vieira MA, Abe, CM *et al.* Adherence patterns and adherence-related
327 DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without

- 328 diarrhea in São Paulo city, Brazil. *J Clin Microbiol* 1998;**36**:3609-3613.
- 329 Guinée PAM, Jansen HW, Wadstrom T *et al.* *Escherichia coli* associated with
330 neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: De Leeww, P.W., Guine' e, P.A.M.
331 (Eds.), *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea: Current Topics in*
332 *Veterinary and Animal Science*, vol. 13. The Netherlands, Martinus Nijhoff, Hague,
333 1981, pp. 126–162.
- 334 Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of enteropathogenic
335 *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin*
336 *Microbiol* 1995;**33**:375-1377.
- 337 Guth BEC, Vaz TM, Gomes TA *et al.* Re-emergence of O103:H2 Shiga toxin-
338 producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. *J Med Microbiol*
339 2005;**54**:805-806.
- 340 Iriño K, Vaz TMI, Kato MAMF *et al.* O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*
341 strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerg*
342 *Infect Dis* 2002;**8**:446-447.
- 343 Jerse AE, Yu J, Tall BD *et al.* A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli*
344 necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture
345 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**:7839–7843.
- 346 Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*
347 2004;**2**:123-140.
- 348 Kobayashi RKT, Saridakis HO, Dias AMG *et al.* Molecular identification of
349 enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with infant diarrhea in
350 Londrina, Parana, Brazil. *Braz J Microbiol* 2000;**31**:275-280.
- 351 Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrheal disease, as estimated
352 from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health*

- 353 *Organ* 2003;**81**:197-204.
- 354 Lima IF, Boisen N, Quetz JS *et al.* Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli*
355 and its virulencerelated genes in a case-control study among children from north-
356 eastern Brazil. *J Med Microbiol* 2013;**62**:683-693.
- 357 Martins FH, Guth BEC, Piazza RM *et al.* Diversity of Shiga toxin-producing
358 *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. *Vet Microbiol*
359 2015;**175**:150–156.
- 360 Medina AM, Rivera FP, Romero LM *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* in human
361 immunodeficiency virus (HIV) pediatric patients in Lima, Peru. *Am J Trop Med*
362 *Hyg* 2010;**83**:158-163.
- 363 Menezes CA, Gonçalves DS, Amianti J *et al.* Capture immunoassay for LT detection
364 produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. *Braz J Microbiol*
365 2003;**34**:11-13.
- 366 Moreno ACR, Filho AF, Gomes TdoA *et al.* Etiology of childhood diarrhea in the
367 northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol*
368 *Infect Dis* 2010;**66**:50-57.
- 369 Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*
370 1998;**11**:142-201.
- 371 Nataro JP. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells.
372 *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 6, n. 9, p. 829-831, set. 1987.
- 373 O’Ryan, M, Prado, V, Pickering, LK. A millennium update on pediatric diarrheal
374 illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005; **16**:125-136.
- 375 Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB *et al.* Etiology of diarrheal infections in
376 children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med*
377 *Biol Res* 2006;**39**:507-517.

- 378 Paschke C, Apelt N, Fleischmann E *et al.* Controlled study on enteropathogens in
379 travelers returning from the tropics with and without diarrhea. *Clin Microbiol Infect*
380 2011;**17**:1194-1200.
- 381 Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia*
382 *coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli*
383 *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* 1998;**36**:598–602.
- 384 Presterl E, Zwick RH, Reichmann S *et al.* Frequency and virulence properties of
385 diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon. *Am J Trop Med*
386 *Hyg* 2003;**69**:406–410.
- 387 Rajendran P, Ajjampur SSR, Chidambaram, D *et al.* Pathotypes of diarrheagenic
388 *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. *Diagn*
389 *Microbiol Infect Dis* 2010;**68**:117–122.
- 390 Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM *et al.* Frequency and characteristics of
391 diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without
392 diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infect* 2004;**48**:161-167.
- 393 Rocha LB, Piazza RM. Production of Shiga toxin by Shiga toxin expressing
394 *Escherichia coli* in broth media: from divergence to definition. *Lett Appl Microbiol*
395 2007;**45**:411–417.
- 396 Rodrigues J, Acosta VC, Candeias JM *et al.* Prevalence of diarrheogenic *Escherichia*
397 *coli* and rotavirus among children from Botucatu. *Braz J Med Bio Res* 2002;**35**:
398 1311-1318.
- 399 Rodriguez-Angeles, G. Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic
400 groups of *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex* 2002;**44**:464-475.
- 401 Scaletsky IC, Fabbricoti SH, Silva SO *et al.* HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains
402 associated with acute diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002;**8**:855-

- 403 858.
- 404 Schmidt H, Knop C, Franke S *et al.* Development of PCR for screening of
405 enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1995;**33**:701–705.
- 406 Stritt A, Tschumi S, Kottanattu L *et al.* Neonatal Hemolytic Uremic Syndrome after
407 mother-to-child transmission of a low-pathogenic stx2b harboring Shiga toxin-
408 producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2012;**56**:114–116.
- 409 Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. EPM – a modification of Rugai and Araujo
410 medium for simultaneous test of gas production from glucose, H₂S, urease and
411 tryptophan deaminase. *Rev Microbiol* 1982a;**3**:309–315.
- 412 Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. MILi – a medium for detection of motility,
413 indole, and lysine decarboxylase. *Rev Microbiol* 1982b;**13**:230–235.
- 414 Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. Typical and atypical enteropathogenic
415 *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002;**8**:508-513.
- 416 Wang G, Clark CG, Rodgers FG. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding
417 the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and
418 components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*
419 2002;**40**:3613–3619.
- 420 Zamboni A, Fabbicotti SH, Fagundes-Neto U *et al.* Enteroaggregative *Escherichia*
421 *coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. *J*
422 *Clin Microbiol* 2004;**42**:1058-63.
- 423 Zheng J, Cui S, Teel LD *et al.* Identification and characterization of Shiga toxin type 2
424 variants in *Escherichia coli* isolates from animals, food, and humans. *Appl Environ*
425 *Microbiol* 2008;**74**:5645–5652.
- 426

Table 1 – Sequences of the oligonucleotides surveyed and size of DNA fragments amplified.

| Gene | Oligonucleotide Sequence (5'→3') | Size (bp) | Reference |
|--------------|--|-----------|------------------------------------|
| <i>bfpA</i> | (F) CAATGGTGCTTGCCTTGGT (R) GCCGCTTTATCCAACCTGGT | 326 | Gunzburg; Tornieporth; Riley, 1995 |
| <i>eae</i> | (F) GACCCGGCACAAGCATAAGC (R) CCACCTGCAGCAACAAGAGG | 384 | Paton; Paton, 1998 |
| <i>stx1</i> | (F)ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC (R)AGAACGCCCACTGAGATCATC | 180 | Paton; Paton, 1998 |
| <i>stx2</i> | (F) GGCCTGTCTGAAACTGCTCC (R) TCGCCAGTTATCTGACATTCTG | 255 | Paton; Paton, 1998 |
| <i>stx2a</i> | (F) GCGGTTTTATTTGCATTAGC (R) TCCCGTCAACCTTCACTGTA | 256 | Wang <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>stx2b</i> | (F) GGTAATAATTGAGTTCTCTAGTATA (R) CAGCAATCCTGAACCTGACG | 175 | Wang <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>stx2c</i> | (F) GCGGTTTTATTTGCATTAGT (R) AGTACTCTTTTCCGGCCACT | 124 | Wang <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Stx2d</i> | (F) CTTTATATACAACGGGTG (R) CTGAATTGTGACACAGATTAC | 359 | Zheng <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>hlyA</i> | (F) GCATCATCAAGCGTACGTTCC (R)AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT | 534 | Paton; Paton, 1998 |
| <i>aaiC</i> | (F) ATTGTCCTCAGGCATTTACACG (R) ACACCCCTGATAAACAA | 215 | Lima <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>aaiA</i> | (F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTCAAGGATTGCCATTAG | 630 | Dudley <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>aatA</i> | (F) CTGGCGAAAGACTGTATCATC (R) AATGTATAGAAATCCGCTGTT | 630 | Schmidt <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>aggR</i> | (F) CTAATTGTACAATCGATGTA (R) ATGAAGTAATTCTTGAAT | 308 | Boisen <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>est</i> | (F) ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT (R) CACCCGGTACARGCAGGATT | 190 | Aranda <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>elt</i> | (F) GGCGACAGATTATACCGTGC (R) CGGTCTCTATATTCCCTGTT | 450 | Aranda <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>ipaH</i> | (F) GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC (R) GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC | 600 | Aranda <i>et al.</i> , 2004 |

Table 2 - Genotypic and phenotypic characteristics of DEC samples from children¹.

| Pathotype | Samples | Genetic Profile | | | | | | | Pattern of adherence (HEp-2) | Serotype |
|-----------|---------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------------------|----------|
| | | <i>eae</i> | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>aggR</i> | <i>aatA</i> | <i>aaiC</i> | <i>aaiA</i> | | |
| aEPEC | 72 | + | - | - | - | - | - | - | AA | O166:H21 |
| aEPEC | 80 | + | - | - | - | - | - | - | AA | NT |
| aEPEC | 138 | + | - | - | - | - | - | - | AA | O51:H40 |
| aEPEC | 139 | + | - | - | - | - | - | - | AA | O1:H18 |
| aEPEC | 154 | + | - | - | - | - | - | - | AA | NT |
| aEPEC | 175 | + | - | - | - | - | - | - | AA | O56:H6 |
| STEC | 6 | - | + | - | - | - | - | - | AA | ONT:H4 |
| STEC | 129 | - | - | + | - | - | - | - | AA | O153:H18 |
| STEC | 130 | - | - | + | - | - | - | - | AA | O86:H18 |
| tEAEC | 49 | - | - | - | + | + | - | - | AA | NTT |
| tEAEC | 95 | - | - | - | + | + | - | - | AA | NTT |
| tEAEC | 96 | - | - | - | + | + | - | + | AA | NTT |
| tEAEC | 104 | - | - | - | + | + | - | + | AA | NTT |
| tEAEC | 105 | - | - | - | + | + | - | + | AA | NTT |
| tEAEC | 121 | - | - | - | + | + | - | - | AA | NTT |
| aEAEC | 106 | - | - | - | - | - | - | + | AA | NTT |
| aEAEC | 117 | - | - | - | - | + | + | - | AA | NTT |
| aEAEC | 125 | - | - | - | - | - | + | - | AA | NTT |

AA, aggregative adherence.

ONT, O antigen non typeable with O1 to O185 antisera.

NT, non typeable.

NTT, non-tested.

¹ aEAEC samples that presented the AA pattern of adherence and were not detected the presence of virulence genes by the PCR, they were not shown in the table.

6 CONCLUSÃO

- Um total de 71 crianças com diarreia foram estudadas, sendo isoladas 87,4% (62 amostras) de DEC.
- A maioria das amostras positivas (53 amostras, 74,7%) pertenciam ao patotipo EAEC com seis (8,5%) amostras do subgrupo tEAEC e 47 (66,2%) do subgrupo aEAEC.
- O gene *aaiC* foi detectado em uma (1,4%) das 47 amostras de aEAEC encontradas, o gene *aaiA* também foi encontrado em apenas uma amostra (1,4%), e uma foi positiva para ambos os genes *aaiC* and *aatA*. Nas outras amostras (62%) de aEAEC não foram detectados genes de virulência adicionais.
- Das seis amostras de tEAEC encontradas, três (4,25%) foram positivas para os genes *aggR*, *aatA* e *aaiA*, enquanto as outras três (4,25%) foram positivas somente para os genes *aggR* e *aatA*.
- 8,5% (seis amostras) de aEPEC (*eae*) foram detectadas neste estudo, entretanto amostras de tEPEC (*eae*, *bfp*) não foram encontradas. O gene *stx* não foi identificado em nenhuma das seis amostras classificadas como *eae*-positiva.
- STEC foi detectada em três (4,2%) amostras. Somente uma (1,4%) apresentou o gene *stx1* enquanto duas (2,8%) apresentaram o gene *stx2*. Os subtipos do gene *stx2* associados com doença severa em humanos (*stx2a*, *stx2c* e *stx2d*) não foram identificados. Além disso, nenhuma das amostras apresentou o gene *ehxA*, para produção da enterohemolisina.
- Amostras portadoras dos genes de virulência para os patotipos EIEC e ETEC não foram detectadas.

- Na análise fenotípica (adesão a células HEp-2), foi observada a predominância do padrão de adesão agregativo.
- Sendo assim, a partir desse estudo, foi possível demonstrar que DEC ainda são patógenos importantes na etiologia da diarreia infantil e que estudos epidemiológicos podem ajudar a minimizar os possíveis perigos desses patógenos, acarretados à saúde pública.