VICTOR RAFAEL CASTILLO MERINO

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE ENTEROPATÓGENOS EM CRIANÇAS
COM E SEM DIARRÉIA NA CIDADE DE SÃO PAULO, SP**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

VICTOR RAFAEL CASTILLO MERINO

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE ENTEROPATÓGENOS EM CRIANÇAS
COM E SEM DIARRÉIA NA CIDADE DE SÃO PAULO, SP**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Julio Avila-Campos

Co-orientador: Profa. Dra. Viviane Nakano

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Castillo Merino, Victor Rafael.

Avaliação quantitativa de enteropatógenos em crianças com e sem diarreia na Cidade de São Paulo, SP / Victor Rafael Castillo Merino. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Mario Júlio Ávila Campos.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bacteriologia de Anaeróbios orais e intestinais.

Versão do título para o inglês: Quantitative analysis of enteropathogens in children with and without diarrhea in São Paulo City, SP.

1. Enteropatógenos 2. Diarreia 3. Crianças 4. Real Time-PCR
I. Campos, Mario Júlio Ávila II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
III. Título.

ICB/SBIB0205/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Victor Rafael Castillo Merino.

Título da Tese: Avaliação quantitativa de enteropatógenos em crianças com e sem diarreia na Cidade de São Paulo, SP.

Orientador(a): Prof. Dr. Mario Júlio Ávila Campos.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Amando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 17 de outubro de 2006.

PARECER 743/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em 69ª Reunião realizada em 11.10.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Avaliação quantitativa de cepas enterotoxigências de bacteroides fragilis e dos respectivos subtipos do gene bft em crianças imunocompetentes com e sem diarreia aguda*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
VICTOR RAFAEL CAS TILLO MERINO
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*A meus pais, Hugo e Betty, pela educação de sempre,
pelas oportunidades e pela motivação constante;
a minha esposa Vanessa e a meus filhos Marina e Rafael
pela força decorrente de sua existência;
a meus irmãos pela aprovação permanente,
e a meus sogros pela compreensão e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Sobre todas as coisas e todo ser, agradeço infinita e eternamente a Deus por dirigir e sustentar constantemente minha vida abençoando-me com realizações e valores, e aliviando as dificuldades encontradas no meu caminho.

Ao Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos pela oportunidade, incentivo, orientação e paciência no decorrer deste trabalho que sem duvida nenhuma traçou um novo perfil técnico e científico na minha vida.

A Profa. Dra. Viviane Nakano pela orientação, amizade e paciência incondicional a todo momento da pesquisa.

À Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, do Laboratorio de Microbiologia do Instituto Butantã, ao Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, à Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, ao Prof. Dr. Sydney Finegold do Veterans Affairs L. A. Medical Center da Universidade da Califórnia e à Dra. Lynne M. Sloan da Clínica Mayo pelo fornecimento de cepas bacterianas padrão para o correto desenvolvimento da técnica molecular aplicada neste estudo.

Aos Hospitais Municipais Infantis, Menino Jesus e Candido Fontoura, e ao Departamento de Pediatria do Hospital Municipal do Tatuapé, a seus Diretores Técnicos e funcionários que colaboraram com a coleta de amostras fecais diarréicas de crianças internadas ou que visitaram o seus Pronto Atendimentos.

Ao Centro de Educação Infantil do Butantã (CEU Butantã), seus Diretores Educacionais, Professores e funcionários que possibilitaram a coleta de amostras de fezes de crianças regularmente inscritas no estabelecimento.

Aos pais e responsáveis das crianças dos Hospitais e do Centro de Educação Infantil Butantã que gentilmente aprovaram a coleta de amostras fecais de suas crianças para a realização do presente estudo.

À minha esposa que me apoiou decisivamente desde o início do trabalho, na coleta e transporte do material a todo momento do dia, e pela sua ilimitada compreensão e paciência perante o esforço diário dedicado à realização deste trabalho científico.

Ao Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) por sua amizade e permanente incentivo e disposição de colaborar à realização desta etapa da minha vida.

Ao amigo e colega de Pós-graduação Luis Antonio Llanco Albornoza pela sua amizade e apoio incondicional ao longo deste período de aprimoramento acadêmico e científico.

Aos colegas do Laboratório de Anaeróbios: Amanda, Alessandra, Fernando, Gerusa, Tais, Amelio, Luciano, Antonio, Alfredo, Carolina, Sheila, Viviane, Aline, Jaqueline, Jessica, Tania, Gisele, Zulmira, Marcia e aos colegas de Pós-graduação por sua motivação e amizade ao longo destes anos, e que direta ou indiretamente contribuíram com a maturação do raciocínio científico forjado na minha carreira profissional.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Microbiologia pelo auxílio científico, intelectual, logístico e funcional recebidos no decorrer do doutoramento.

Aos funcionários do Serviço de Biblioteca do ICB responsáveis pela correção e formatação do trabalho escrito da presente pesquisa doutoral, assim como também a seus funcionários responsáveis pelo empréstimo de livros, material didático e documentação bibliográfica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa, pela bolsa (2007/03655-7) outorgada durante estes 4 anos de Doutorado.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Procure ser uma pessoa de valor,
em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso.
O sucesso é só consequência.”*

*“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados,
capacita os escolhidos.
Só há duas maneiras de viver a vida:
a primeira é vivê-la como se os milagres
não existissem.
A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”*

Albert Einstein

RESUMO

MERINO, V. R. C. **Avaliação quantitativa de enteropatógenos em crianças com e sem diarreia na cidade de São Paulo, SP.** 2012. 99 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A diarreia aguda é a segunda causa de morte em crianças < 5 anos em países emergentes. Anaeróbios estritos intestinais como *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico e *Clostridium difficile* estão associados a este quadro infeccioso, assim como também, *Escherichia coli* diarreiogênica, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia enterocolitica*. Neste estudo, foi avaliada quantitativamente por PCR em Tempo Real a presença de enteropatógenos diretamente de amostras fecais de crianças com (110) e sem (150) diarreia. Entre as species ETBF o subtipo 1 (*bft-1*) foi o mais prevalente representando 90% dos casos diarreicos e 100% dos não diarreicos; o subtipo 3 (*bft-3*) foi detectado em apenas uma amostra fecal diarreica, enquanto que o subtipo 2 (*bft-2*) não foi detectado em nenhum dos grupos avaliados. *C. difficile* toxigênico foi detectado em 5,4% das amostras diarreicas e em 9,1% das não diarreicas em crianças menores de 2 anos de idade. Entre as species de *Escherichia coli* diarreiogênicas, EPEC/EHEC e EAEC foram as mais prevalentes em ambos os grupos: 33,6% e 27,2% no diarreico, e 14% e 26,6% no não diarreico, respectivamente. Todos os enteropatógenos avaliados foram detectados nas crianças com e sem diarreia, à exceção de *Salmonella* spp. e *Y. enterocolitica* que foram observados somente em fezes diarreicas. A maior parte dos enteropatógenos detectados pertenceram às amostras fecais de crianças de até 2 anos de idade mostrando uma relação estreita entre essas bactérias e os casos diarreicos ou não diarreicos. A presença de espécies EPEC/EHEC e de *Shigella* spp./EIEC mostraram valores estatisticamente significativos.

Palavras-chave: Enteropatógenos. Diarreia. Crianças. PCR Tempo Real.

ABSTRACT

MERINO, V. R. C. **Quantitative analysis of enteropathogens in children with and without diarrhea in São Paulo city, SP.** 2012. 99 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Diarrhea is considered as major cause of mortality and morbidity in worldwide, achieving children < 5 years old, and it is the second cause of death in emerging countries. Intestinal anaerobes, such as enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Clostridium difficile* are associated to acute diarrhea, as well as diarrheogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. and *Yersinia enterocolitica*. In this study, a quantitative evaluation of the presence of enteropathogens from fezes was performed. Stools from children with (110) and without (150) diarrhea were collected. Among ETBF species, subtype 1 (bft-1) was the most prevalent in diarrhea (90%) and of não diarrhe samples. Subtype 3 (bft-3) was detected only in one diarrhea specimen; subtype 2 (bft-2) was not detected in any of the fecal specimens. Toxigenic *C. difficile* was detected in 5.4% of diarrhea and in 9.1% of non-diarrhea specimens in children under 2 years old. *Escherichia coli* species, EPEC/EHEC and EAEC were the most prevalent in both groups: 33.6% and 27.2% in diarrhea and 14% and 26.6% in non-diarrhea samples, respectively. All the evaluated enteropathogens were detected in children with and without diarrhea, except *Salmonella* spp. and *Y. enterocolitica* that were only observed in diarrhea samples. Most of enteropathogens were detected from fecal specimens in children under 2 years old, showing a closely bacterial relationship in both groups. The presence of EPEC/EHEC and *Shigella* spp./EIEC showed statistically significant values.

Keywords: Enteropathogens. Diarrhea. Children. Real Time-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ilha de Patogenicidade de <i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigênico.....	16
Figura 2- Curvas-padrão de ETBF, <i>C. difficile</i> e <i>E. coli</i> enteropatogênico.....	46
Figura 3- Detecção do gene <i>bft</i> por PCR.....	53
Figura 4- Detecção do subtipo bft-1 por Multiplex-PCR.....	54
Figura 5- Curva-padrão para <i>C. difficile</i> e amplificação de DNA positivo.....	55
Figura 6- Detecção dos genes <i>tcdA</i> e <i>tcdB</i> de <i>C. difficile</i> por Multiplex-PCR..	56
Figura 7- Frequência de enteropatógenos avaliados.....	60
Figura 8- Distribuição de enteropatógenos como único agente.....	63
Figura 9- Número de cópias detectadas para cada enteropatógeno.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequências de iniciadores e sondas para ETBF e subtipos.....	50
Tabela 2- Sequências de iniciadores e sondas para <i>C. difficile</i>	51
Tabela 3- Sequências de iniciadores e sondas para enterobactérias.....	52
Tabela 4- Distribuição de espécies ETBF e subtipos.....	57
Tabela 5- Distribuição de <i>C. difficile</i>	58
Tabela 6- Análise quantitativa de espécies ETBF e <i>C. difficile</i>	59
Tabela 7- Distribuição das bactérias entéricas nas amostras fecais.....	61
Tabela 8- Distribuição de enteropatógenos por faixa etária.....	62
Tabela 9- Análise quantitativa de genes de bactérias entéricas.....	64
Tabela 10- Associações bacterianas detectadas.....	66
Tabela 11- Distribuição das associações bacterianas.....	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 ANÁLISE DA LITERATURA.....	21
2.1 Microbiota envolvida nos processos diarreicos.....	21
2.2 Espécies <i>Bacteroides fragilis</i>.....	23
2.2.1 Patogenese de <i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigênico (ETBF).....	25
2.2.2 Aspectos clínicos envolvendo ETBF.....	26
2.3 Espécie <i>Clostridium difficile</i>.....	27
2.3.1 Patogênese de <i>Clostridium difficile</i> toxigênico.....	28
2.3.2 Aspectos clínicos da infecção por <i>Clostridium difficile</i>	31
2.4 Enteropatógenos: patogenia e aspectos clínicos.....	33
2.4.1 <i>Escherichia coli</i>	33
2.4.2 <i>Salmonella</i> spp.	37
2.4.3 <i>Shigella</i> spp.	38
2.4.4 <i>Yersinia enterocolitica</i>	39
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Amostras clínicas.....	43
4.2 Detecção bacteriana: <i>Bacteroides fragilis</i>, <i>Clostridium</i> e enterobactérias.....	43
4.2.1 Extração do DNA bacteriano.....	43
4.2.2 Determinação da concentração do DNA bacteriano.....	44
4.2.3 Construção da curva-padrão para ensaios de Real Time-PCR.....	44
4.2.4 Determinação qualitativa e quantitativa de <i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigênicos.....	45
4.2.4.1 Detecção e subtipagem qualitativa de ETBF e respectivos subtipos por multiplex-PCR.....	45
4.2.4.2 Detecção e subtipagem quantitativa de ETBF por Real Time PCR.....	47
4.2.5 Determinação qualitativa e quantitativa de <i>Clostridium difficile</i>	47

4.2.5.1 Detecção quantitativa de <u>C. difficile</u> por Real Time-PCR.....	47
4.2.5.2 Detecção qualitativa dos toxinotipos de <u>C. difficile</u> por multiplex PCR.....	48
4.2.6 Detecção quantitativa de enterobactérias.....	48
4.3 Análise estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	53
6 DISCUSSÃO.....	68
7 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO – ARTIGO DE PERIÓDICO PUBLICADO.....	97

1 INTRODUÇÃO

A microbiota residente gastrointestinal se instala no decorrer dos primeiros meses após o nascimento, e essa microbiota residente cumpre uma importante função no equilíbrio ecológico colaborando para o bem estar do organismo humano (BISCHOFF, 2011; WALLACE et al., 2011).

O desequilíbrio entre a microbiota residente e a homeostase do trato gastrointestinal leva ao desenvolvimento de doenças infecciosas, entre elas a diarreia aguda, a qual é caracterizada quando três ou mais evacuações líquidas ou semi líquidas são observadas.

Os processos diarreicos constituem-se uma das principais causas de mortalidade infantil, sendo responsáveis por aproximadamente 13% das mortes no mundo inteiro, particularmente em crianças menores de cinco anos de idade, e em países emergentes com baixa ou média renda econômica (MATHERS et al., 2003).

A diarreia é uma doença autolimitada e geralmente não deve ser tratada com antibióticos, a não ser em casos graves. Assim, na clínica médica o correto diagnóstico e o rápido tratamento dessa doença são de vital importância. Este processo pode ser desencadeado por vários agentes infecciosos, entre eles bactérias, vírus e/ou parasitas. Dentre esses, os vírus são os causadores de diarreia mais comumente observados, entretanto, a presença de bactérias merece atenção, em particular microrganismos toxigênicos que segundo a literatura estão envolvidos nesses processos infecciosos (MCCLARREN; LYNCH; NYAYAPATI, 2011).

Sabe-se que, a presença de bactérias tais como *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico, e enterobactérias são capazes de desenvolver processos diarreicos em humanos e animais. Também, esses processos são mais severos quando crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos são afetados (ROSSIT et al., 2007). Dentre esses microrganismos bacterianos podem se destacar as espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Clostridium*, por serem bactérias anaeróbias, e as enterobactérias, espécies intestinais facultativas.

As espécies do gênero *Bacteroides* são relevantes no ser humano por participarem do estado de saúde e de doença, além da sua diversificada ação

bioquímica e fisiológica, e pela transferência de material genético intra e inter-espécies, o que colabora com o potencial patogênico (SALYERS, 1984).

Desse gênero, a espécie *Bacteroides fragilis* se destaca pela predominância no cólon humano, e particularmente pela capacidade de produzir uma potente enterotoxina a qual esta associada à diarreia aguda em homem e animais (MOORE; HOLDEMAN, 1974; MYERS et al., 1984, 1987; SACK et al., 1994).

Bacteroides fragilis enterotoxigênico denominado de ETBF produz uma toxina (BFT) codificada pelo gene *bft*, que consiste em uma sequência de leitura aberta (ORF) de 1.191 nucleotídeos que codificam a produção de uma proteína de 3.978 aminoácidos (FRANCO, 1997; KLING et al., 1997). São conhecidos três alelos do gene *bft*, sendo *bft-1* derivado da cepa ETBF VPI 13784 (isolado de suíno), *bft-2* da cepa 86-5443-2-2 (isolado de cordeiro), e *bft-3* derivado da cepa Korea 419 (isolado de humano) (CHUNG, 1999; FRANCO et al., 1997; KATO et al., 2000). Esses alelos são estruturalmente distintos, mas apresentam similaridade de 92% a 96% na sequência de aminoácidos.

O gene *bft* está contido na ilha de patogenicidade denominada BfPAI de 6 Kb a qual é utilizada para diferenciar as espécies ETBF das não-enterotoxigênicas (NTBF). Dessa forma, apresentam-se três padrões definidos: padrão I, cepas ETBF, aquelas que abrigam a região de 18 Kb; padrão II, cepas NTBF e que não possuem a região de 18 Kb; e padrão III, cepas NTBF que abrigam apenas a região de 12 Kb dos segmentos laterais de DNA (Figura 1) (FRANCO et al., 1999, 2002; MONCRIEF et al., 1998).

Bacteroides fragilis enterotoxigênico tem sido associado a episódios diarreicos no ser humano, principalmente em crianças (DURMAZ; DALGALAR; DURMAZ, 2005; SEARS et al., 2008; VU NGUYEN et al., 2005).

Figura 1- Esquema da ilha de patogenicidade (região de 6-Kb) ancorado no DNA cromossômico das cepas *B. fragilis* enterotoxigênicas e padrões genéticos.

FONTE: Franco et al. (2002).

Outro grupo bacteriano de importância nesses processos diarreicos são as espécies do gênero *Clostridium*. Dentre essas espécies destacamos a participação de *Clostridium difficile* em processos infecciosos de origem hospitalar associado particularmente ao tratamento com antimicrobianos produzindo colite pseudomembranosa (BRAZIER, 2001). Tipos toxigênicos dessa espécie bacteriana têm sido observados como agentes causadores de diarreia e de colite (BARTLETT; GERDING, 2009).

Nos últimos anos, a presença de *C. difficile* em infecções extra-hospitalares tem sido consideravelmente aumentada. É importante mencionar que, alguns indivíduos podem ser considerados como portadores assintomáticos, facilitando assim, a transmissão de *C. difficile* e podendo ser isolados em até 3% de adultos saudáveis e 80% de crianças e recém nascidos (HURLEY; NGUYEN, 2002).

Clostridium difficile produz duas toxinas importantes na patogênese da diarreia: toxina A (enterotoxina) e toxina B (citotoxina) que possuem pesos moleculares de 308 kDa e 279 kDa, respectivamente. Estas toxinas são transcritas a partir de um locus de patogenicidade cromossômico conhecido como PaLoc, de 19,6 Kb, que abriga outros genes acessórios como *tcdE*, *tcdD* e *tcdC* (VOTH; BALLARD; 2005). As toxinas A e B têm sido amplamente investigadas por representar os principais fatores de virulência de *C. difficile*. Posteriormente, foi estabelecida uma correlação entre os níveis de toxinas nas fezes e a severidade das doenças associadas a *C. difficile* (AKERLUND et al., 2006).

Adicionalmente, observam-se algumas cepas de *C. difficile* que produzem ADP-ribosiltransferase (CDT) ou toxina binária que age danificando especificamente a actina do citoesqueleto celular. Esta toxina está formada por duas unidades: CDTa (fragmento enzimático) e CDTb (fragmento de ligação a membrana), as quais são codificadas por dois genes específicos: *cdtA* e *cdtB* (PERELLE et al., 1997). A toxina também é considerada um fator de virulência adicional, devido aos efeitos citopáticos que produz em células cultivadas *in vitro* (SCHWAN et al., 2009).

De um modo geral as enterobactérias vêm se apresentando como importantes patógenos oportunistas (AL-JARROSHA; EL JAROU; EL QOUQA, 2011). Dentre elas, a *Escherichia coli* tem a capacidade de produzir vários fatores de virulência, capazes de desenvolver processos infecciosos intra e extra-abdominais. Os processos diarreicos também podem ser produzidos por esta espécie a qual se caracteriza porque apresenta diversos patótipos os quais são sorotipados em base à combinação específica de antígenos de superfície como somático (O) e flagelar (H) que definem o sorogrupo (O-tipo) ou sorotipo (O- e H-tipo) (NATARO; KAPER, 1998).

Por outro lado, espécies de *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC) são divididas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora

(EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DEAC), as quais podem ser encontradas em quadros clínicos de diarreia aguda em crianças, particularmente em países emergentes (CLARKE, 2001). Segundo O’Ryan, Prado e Pickering (2005), espécies diarreio gênicas são responsáveis por 30% a 40% dos casos de diarreia em países em desenvolvimento.

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos facultativos gram negativos e são considerados patógenos intracelulares do trato intestinal humano sendo relacionados às manifestações clínicas como febre entérica e bacteremias (OHL; MILLER, 2001).

A salmonelose pode ser causada pela ingestão de produtos de origem animal contaminados por *Salmonella enterica*, provocando após 12-36 horas o quadro diarreico. Durante o processo infeccioso por *Salmonella* o hospedeiro manifesta suas defesas das mais variadas formas, sejam pela acidez estomacal, ou por estimulação imunitária; no entanto, a sua capacidade virulenta é complexa, envolvendo toxinas, adesinas e invasinas, que são expressas em base aos elementos genéticos localizados no cromossomo ou plasmídeos, alocados nas Ilhas de Patogenicidade (SPI), normalmente presentes em espécies patogênicas (HACKER et al., 1997).

Dentre as SPI observadas em *Salmonella*, as SPI-1 e SPI-2 são necessárias para a invasão e a replicação intracelular. O tipo SPI-1 contém o gene *invA*, que tem como função aumentar a capacidade invasiva da *Salmonella* às células epiteliais. Também, a proteína *invA* faz parte do mecanismo de secreção tipo III presente na SPI-1 (MARCUS et al., 2000; SUAREZ; RUSSMANN, 1998).

Alguns trabalhos no Brasil e no mundo estudaram os possíveis agentes etiológicos da diarreia infantil e observaram que a prevalência de *Salmonella* em quadros diarreicos em crianças menores de 2 anos de idade, é elevado, variando a taxa de isolamento de 5,6% a 9,5% dos casos avaliados. Estudo realizado no Nordeste Brasileiro envolvendo crianças com diarreia e sem diarreia, relatou uma prevalência de 8% para esta bactéria e estando envolvida em 28% das associações bacterianas detectadas no grupo diarreico. Além disso, esta bactéria foi encontrada como único patógeno em 4,1% dos casos diarreicos analisados (AL-GALLAS et al., 2007; ALMEIDA et al., 1998; GOMES et al., 1991; MORENO et al., 2010).

O gênero *Shigella* está formado por quatro espécies que estão envolvidas nos processos denominados de shigellose ou disenteria bacilar (*S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae*). Sabe-se que, estes patógenos são responsáveis por mais

de 164 milhões de casos de shigelose no mundo todo, com aproximadamente um milhão de mortes por ano, das quais 99% ocorrem em países emergentes, sendo 61% destas em crianças menores de 5 anos de idade (KOTLOFF et al., 1999).

As shigeloses estão intimamente ligadas às condições sanitárias das comunidades, fato pelo qual se constitui em um problema de Saúde Pública. A sua transmissão ocorre por via fecal-oral e através de águas ou alimentos contaminados. A quantidade de microrganismos ingeridos necessária para causar a infecção é de aproximadamente 10 a 100 bactérias provocando uma variedade de sintomas como febre, dor abdominal e fezes sanguinolentas. Uma vez no intestino grosso a *Shigella* é capaz de invadir células e se disseminar pelas células epiteliais (KOH et al., 2012; NIYOGI, 2005).

No caso específico de *S. flexneri*, primeiramente penetra as células M de onde é translocado para as células epiteliais adjacentes. Após a invasão, este microrganismo é liberado na região intra epitelial, onde em contato com os macrófagos induz o processo inflamatório, e pela apoptose do macrófago, efetua a invasão basolateral para outras células epiteliais (SCHROEDER; HILB, 2008). Assim, a inflamação do local junto com a destruição da camada epitelial aumenta a lesão tecidual causando o processo diarréico.

Os genes envolvidos na invasão de *S. flexneri* estão contidos em um plasmídeo de 220 Kb, onde apenas 31 Kb servem para a expressão de proteínas necessárias à invasão, entre elas, as proteínas Ipa e a estrutura de um sistema de secreção tipo III (MENARD et al., 1996; SANSONETTI; KOPECKO; FORMAL, 1982; TRAN; SANSONETTI, 1999).

No Brasil, Pedra et al. (1995) relataram uma incidência de 3,1% de *Shigella* sp. em crianças com enterite grave e de 22,3% nos casos de disenteria. Outros estudos relataram prevalências que variavam de 2,7% a 8,4% deste microrganismo entre as amostras fecais avaliadas (LEAL et al., 1998; MEDEIROS et al., 2001). No entanto, a espécie *S. sonnei* é mais prevalente em países emergentes, em quanto que em países desenvolvidos, a *S. flexneri* é a mais prevalente (KOTLOFF et al., 1999)

Yersinia enterocolitica, bacilo gram-negativo capaz de se movimentar pela presença de flagelos peritríquios constitui-se um importante patógeno gastrointestinal capaz de causar diarreia em humanos, principalmente em crianças. A via de infecção

costuma ser por ingestão de alimentos ou águas contaminadas. No entanto, a yersiniose pode ser causada pela ingestão de carne de porco mal cozida, uma vez que esse animal é reservatório natural dessa espécie (BOTTONNE, 1999; FALCÃO et al., 2004).

A infecção por *Y. enterocolitica* começa normalmente no intestino delgado aderindo e invadindo as células epiteliais afetando principalmente crianças abaixo de 5 anos de idade e produzindo diarreia, febre baixa e dores abdominais. Este microrganismo pode ser classificado em sorotipos bem definidos (sorotipos 1A, 1B, 2,3,4 e 5) e sua virulência está representada por genes localizados no plasmídeo pYV que codifica a produção de enterotoxina termoestável denominada Yst (FALCÃO; FALCÃO, 2006; SING; VIRDI, 2004).

De modo geral e no âmbito nacional, estudos recentes têm mostrado a predominância de *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) nos quadros infecciosos diarreicos, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade. Desta forma, nas últimas duas décadas pode-se verificar a prevalência das DEC que variam de 21,5% a 26%. Já as prevalências relativas a *Salmonella* e *Shigella* associadas a diarreias tem valores que variam de 0,7% a 10% e de 0,6% a 21%, respectivamente, para o mesmo período analisado (ALMEIDA et al., 1998; BUERIS et al., 2007; GOMES et al., 1991; MORENO et al., 2010).

2 ANÁLISE DA LITERATURA

2.1 Microbiota envolvida nos processos diarréicos

A microbiota intestinal, conjunto de microrganismos que vivem no organismo humano, merece importante atenção não somente pela contribuição na digestão de certos nutrientes que chegam ao lúmen e o fornecimento de energia. Mas também, pela sua cooperação na prevenção contra a colonização e infecção de microrganismos patogênicos, e o amadurecimento de células imunitárias intestinais que resultam no bem estar geral do ser humano.

Esta microbiota residente se instala a partir do nascimento e estabiliza-se ao longo dos dois primeiros anos de vida. O recém nascido é colonizado logo no início por bactérias que habitam a cavidade vaginal materna ou do ambiente quando o parto é cesariano. No entanto, podem existir algumas diferenças na diversidade microbiana inicial dependendo da forma de nascimento, e que posteriormente poderia afetar o desenvolvimento normal das crianças como doenças atópicas, alergias e crises asmáticas (BAGER; WOHLFAHRT; WESTERGAARD, 2008; DOMINGUEZ-BELLO et al., 2011; PENDERS et al., 2007).

Inicialmente, o trato gastrointestinal sofre a colonização de bactérias facultativas como *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* as quais ajudam a reduzir o meio intestinal consumindo o oxigênio existente, sendo que no decorrer do tempo, esta população bacteriana é substituída pelos microrganismos anaeróbios estritos como *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp (SEKIROV et al., 2010).

Adicionalmente, a microbiota é modelada por fatores bióticos do ser humano que determinam as bases físico-químicas do habitat intestinal e por fatores externos como a dieta e o uso de antimicrobianos (COLLINS; GIBSON, 1999).

Assim, a relação harmoniosa estabelecida entre o organismo humano e a sua microbiota intestinal, denominada simbiose, define o estado de saúde gastrointestinal do indivíduo. Toda alteração genética ou fisiológica das células humanas, ou mesmo da diversidade microbiana, como o uso de antibióticos ou dieta alimentar desequilibrada, que ocorra neste nicho ecológico pode acarretar estados de

desequilíbrio e, por conseguinte a doença (MAGALHAES; TATTOLI; GIRARDIN, 2007).

Segundo Bischoff (2011), a saúde intestinal está intimamente associada ao bom funcionamento da barreira epitelial e por consequência à estabilidade da microbiota residente. Qualquer alteração deste nicho ecológico leva ao desequilíbrio e a um estado não saudável do indivíduo como ocorre quando se estabelece uma infecção bacteriana ou viral que permeabiliza o epitélio causando extravasamento de água e sais à luz intestinal e caracterizando um quadro diarréico infeccioso.

Os processos infecciosos diarréicos no homem podem ter existido desde os primórdios da civilização humana possibilitada pelo sedentarismo, por existirem condições de manutenção e propagação de doenças, isto é, suficiente conglomerado humano se relacionando num mesmo local. Por outro lado, a domesticação de alguns animais poder ter dado origem as primeiras zoonoses envolvendo microrganismos como *Ascaris lumbricoides* e *Shigella*, através do porco e macaco, respectivamente (LIM; WALLACE, 2004).

Etimologicamente a palavra diarréia deriva do grego “*diarrhoia*” que significa “fluir através de” ou “fluxo do ventre”, e que segundo o médico grego Hipócrates era causado pelo desequilíbrio dos humores fisiológicos do homem assim como pelas variações climáticas. Hipócrates, avaliando um surto de disenteria, descreveu fezes sanguinolentas, e considerou a água a causa da mesma, que ele já pressupunha era de extrema importância para a saúde. Também, observou que estes fenômenos costumavam ocorrer nos períodos quentes de verão determinando-se a sazonalidade dos processos infecciosos (FALAGAS et al., 2010; LIM; WALLACE, 2004).

Já nos tempos atuais, sem as dificuldades de poder relatar e registrar os episódios diarréicos podê-los diagnosticar em detalhe e tratá-los oportunamente, assume-se que epidemias desta índole não atingiriam novamente a civilização moderna. Contudo, esta doença ainda é considerada uma ameaça de ordem pública, principalmente nos países emergentes, onde a morbidade e mortalidade infantil permanecem elevadas (AHS et al., 2010; PETRI JR et al., 2008).

Desta forma, pelos últimos relatórios da World Health Organization/WHO (2009) e por inúmeras pesquisas ao redor do mundo, principalmente no hemisfério sul, que associam a alta incidência de diarréias em crianças menores de 5 anos de idade à

elevada mortalidade infantil na mesma faixa etária, considera-se de imensurável importância o desenvolvimento de diagnósticos rápidos e precisos para estes processos infecciosos (KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003).

2.2 Espécies *Bacteroides fragilis*

A espécie *Bacteroides fragilis* foi primeiramente descrito por Veillon e Zuber, em 1898, fazendo parte do gênero *Bacteroides*. Posteriormente, foram agrupadas todas as espécies que correspondiam aos critérios gerais sobre *B. fragilis* no “grupo *fragilis*” com varias subespécies (HOLDEMAN; MOORE, 1974; MOORE; HOLDEMAN, 1973).

Espécies de *Bacteroides* são bacilos gram-negativos, anaeróbios estritos, pleomórficos, vacuolizados, quimiorganotróficos, sacarolíticos e beta-hemolíticos. As espécies deste gênero são microrganismos bile-resistentes, hidrolisam esculina e fermentam glicose, lactose, sacarose, maltose e xilose. Alguns de seus produtos de fermentação incluem succinato, lactato, acetato, formato, propionato e isobutirato (MACY, 1979), e aproveitam o dióxido de carbono incorporando-o ao ácido succínico (CALDWELL; KEENEY; VAN SOEST, 1969), além de requerer hemina e vitamina K para a síntese de citocromos e NADH-fumarato oxidoredutase (MACY, 1979).

Essas espécies podem migrar do cólon intestinal para outros órgãos através da barreira epitelial, e participar na formação de abscessos, infecções teciduais e bacteremias sendo considerada importante dentre os anaeróbios pela sua frequência em isolados clínicos e pela sua resistência aos agentes antimicrobianos (HOFTAD, 1979).

Apesar de *B. fragilis* representar 0,3% do total de todas as espécies do gênero *Bacteroides*, a mesma está presente em mais de 80% das infecções atribuídas a estes microrganismos (HOLTON, 2008). Assim, *B. fragilis* é considerado o anaeróbio mais comumente isolado de amostras clínicas humanas, e reside no cólon humano totalizando aproximadamente de 1 a 2% da microbiota intestinal (LASSMANN et al., 2007; MOORE; HOLDEMAN, 1974; SEARS, 2009).

O grupo *B. fragilis* classificava-se em: *B. distasonis*, *B. fragilis*, *B. eggerthii*, *B. ovatus*, *B. uniformis*, *B. vulgatus* e *B. thetaiotaomicron*. Posteriormente, estudos genéticos sobre a homologia do DNA de espécies de *Bacteroides*, levaram a

Johnson e Harich (1986), a incorporar três novas espécies as sete já classificadas: *B. caccae*, *B. merdae* e *B. stercoris*.

O gênero *Bacteroides* tem sofrido importantes mudanças taxonômicas. No este gênero compreendia mais de 60 espécies (HOLDEMAN; MOORE, 1974); entretanto, pela heterogeneidade delas em relação aos aspectos fisiológicos e bioquímicos, foi proposto por Shah e Collins (1989), que este gênero fosse restrito à espécie *Bacteroides fragilis* e a microrganismos estritamente relacionados.

O aprimoramento de técnicas moleculares como o sequenciamento do gene 16S rRNA e a hibridização DNA-DNA têm ajudado de forma decisiva na atual classificação destas espécies bacterianas, tendo sido várias delas remanejadas para outros gêneros, como *Prevotella* e *Porphyromonas*.

O filo *Bacteroidetes*, representado por bacilos gram-negativos, em 4 classes: *Bacteroidia*, *Cytophagia*, *Flavobacteriia* e *Sphingabacteria*. Ao mesmo tempo, a classe *Bacteroidia* possui uma única ordem: *Bacteroidales* que por sua vez contém 5 famílias: *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Marinilabiliaceae* e *Prevotellaceae*. Esta reclassificação foi baseada em análises filogenéticas do gene 16S rRNA (KRIEG et al., 2010). Atualmente, o gênero *Bacteroides* compreende 25 espécies bem definidas (SONG; LIU; FINEGOLD, 2010).

A maior parte dos representantes bacterianos da microbiota intestinal não é infecciosa quando migram do cólon humano em direção aos tecidos adjacentes. Entretanto, *B. fragilis* tem características patogênicas que lhe conferem resistência ao sistema imune sendo a sua camada capsular polissacarídica um dos mecanismos de patogenicidade mais estudados (TZIANABOS, 1994; TZIANABOS; KASPER; ONDERDONK, 1995).

A cápsula está composta de dois polissacarídeos distintos que são denominados PSA e PSB contendo unidades repetidas de carboidratos, formados por sua vez de grupos amino carregados positivamente e grupos carboxil negativamente, além de grupos fosfatos (PANTOSTI et al., 1993).

Bacteroides fragilis possui também um elevado potencial invasivo, processo que é favorecido pela produção de proteinases, neuraminidase, hialuronidases, fosfatases e DNases (JOTWANI et al., 1991; NAKANO et al., 2007; NAMAVAR et al., 1991).

2.2.1 Patogenese de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico (ETBF)

Bacteroides fragilis apresenta vários fatores de virulência tais como a síntese de proteínas extracelulares, resistência a antibióticos e à fagocitose, além de uma cápsula polissacarídea e uma toxina de 20 kDa zinco-dependente (MONCRIEF et al., 1995; PATRICK et al., 2003).

A produção da toxina de *Bacteroides fragilis* (BFT) chamada também de fragilisina é codificada pelo gene *bft* (*Bacteroides fragilis* toxin) correspondente a uma sequência nucleotídica de 1.191 bp (FRANCO et al., 1997; KLING et al., 1997), que está localizada na Ilha de Patogenicidade de 6 Kb denominada BfPAI (FRANCO et al., 1999; MONCRIEF et al., 1998).

O gene *bft* possui três subtipos: *bft-1*, *bft-2* e *bft-3*. Os alelos correspondentes a esses três subtipos têm elevada homologia entre si, variando de 92% a 96% de similaridade nas sequências peptídicas. No entanto, foi observado que dentre os subtipos da toxina BFT, a BFT-2 possui maior poder citotóxico, e a BFT-3 seria menos tóxica que BFT-2 (CHUNG et al., 1999; FRANCO et al., 1997; KATO et al., 2000; SEARS, 2001).

Também, foi relatada a presença de outras sequências de leituras abertas (ORF) adjacentes ao gene *bft* que codifica a produção da metaloprotease II (MPII). Contudo, esta proteína não teve sua atividade biológica comprovada no processo diarréico (FRANCO et al., 1999).

Alguns pesquisadores têm mostrado a não invasividade de cepas ETBF, porém foi observada a sua capacidade em alterar proteínas de superfície (DONELLI; FABRI; FIORENTINI, 1996; OBISO; AZGHANI; WILKINS, 1997; SEARS, 2001).

Saidi et al. (1997) e Wu et al. (1998) verificaram a capacidade da fragilisina em clivar E-caderina na zona de aderência das células epiteliais. Assim, estudos realizados com linhagens celulares HT29/C1 mostraram a ação degradativa de BFT em apenas 1 minuto (WU et al., 2007). A ação da toxina atinge diretamente a interação proteína-proteína entre células epiteliais adjacentes diminuindo o contato celular podendo alterar o transporte de íons que resulta no acúmulo de líquidos no lúmen intestinal (SEARS, 2001).

A natureza enterotoxigênica de *B. fragilis* foi originalmente descoberta por Myers et al. (1985), isolando este microrganismo em grandes quantidades em fezes

diarréicas de animais de fazenda na ausência de outros patógenos. Essas cepas quando injetadas em íleo de cordeiros causavam acúmulo de líquidos (teste da alça intestinal ligada).

Os primeiros estudos associando *B. fragilis* enterotoxigênico (ETBF) às diarréias em humanos foram reportados por Myers et al. (1987) e Sack et al. (1992), que identificaram estas espécies nas fezes de crianças e adultos com diarréia.

2.2.2 Aspectos clínicos envolvendo *B. fragilis* enterotoxigênico

Estudos referentes ao isolamento ou detecção de espécies ETBF de diversos materiais clínicos colocam *B. fragilis* como sendo a espécie mais comumente isolada entre o grupo *B. fragilis*.

Os primeiros casos clínicos envolvendo ETBF foram reportados em animais como cordeiros, bezerros e leitões que desenvolviam processos diarréicos (MYERS et al., 1984). Posteriormente, isolados enterotoxigênicos foram testados em alças intestinais ligadas observando-se acúmulo de fluídos; ao mesmo tempo a espécie ETBF foi associada como possível enteropatógeno causador de diarréias em humanos (MYERS et al., 1987).

Vários estudos têm associado ETBF a processos diarréicos em crianças e adultos. San Joaquin et al. (1995), em estudo controlado em crianças menores de 5 anos de idade, observaram a presença de ETBF em 4% dos casos com diarréia, enquanto que, esta espécie estava presente em apenas 1% das crianças sem diarréia. Similarmente, Sack et al. (1994), observaram que a presença de ETBF variava de 5,4% a 12% nos casos diarréicos e que sua presença era menor nos casos controle, variando de 1,8% a 6%.

Já em estudo realizado na Itália por Pantosti et al. (1997), não se observou relação entre a sintomatologia da diarréia e a presença de ETBF. Foi observada a presença desta espécie em 15% das amostras de indivíduos normais e em 9,4% dos indivíduos acometidos por diarréia. Contudo, Zhang et al. (1999) observaram uma maior prevalência de espécies ETBF em pacientes com diarréia (27%) quando comparados com o grupo controle (12%).

Caceres et al. (2000) destacaram alguma diferença na presença de espécies ETBF ao analisar fezes diarreicas de crianças menores (11,1%) e maiores (4,6%) de 1 ano de idade, e no grupo controle não se observou a presença de espécies ETBF.

No Brasil, tem sido observado baixa prevalência de ETBF em fezes diarreicas entre crianças menores de 5 anos de idade, variando de 1 a 2 amostras positivas para ETBF (ANTUNES et al., 2002; KRZYZANOWSKY; AVILA-CAMPOS, 2003). Entretanto, recentemente, em estudo realizado na cidade de São Paulo, Merino et al. (2011) relataram uma prevalência de 9% destas espécies entre amostras fecais diarreicas de crianças.

Por outro lado, Bressane, Durigon e Avila-Campos (2001) observaram cepas enterotoxigênicas em fezes não diarreicas de uma criança com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) sem diarreia no momento da coleta, mas que tinha apresentado quadro diarreico dias antes. Posteriormente, Nakano et al. (2007) subtiparam cepas ETBF proveniente de uma criança com AIDS e de duas crianças imunocompetentes com diarreia; todas as cepas *bft* observadas foram subtipadas como *bft-1*.

Apesar dos resultados, ao analisar a presença de ETBF em fezes diarreicas e não diarreicas, não serem estatisticamente significativos em crianças menores de 1 ano, observa-se uma correlação entre as espécies ETBF e os processos diarreicos em crianças maiores de 1 ano de idade. Contudo, a frequência, em diferentes países, de espécies ETBF em fezes diarreicas varia consideravelmente sendo, por exemplo, de 3,5% em Bangladesh e de 27% na Suécia (ALBERT et al., 1999; ZHANG et al., 1999).

2.3 Espécie *Clostridium difficile*

Clostridium difficile foi descrito pela primeira vez por Hall e O'Toole (1935) em fezes de recém nascidos saudáveis e foi denominando *Bacillus difficile* pela dificuldade em isolar e fazer crescer este microrganismo em meio de cultura. Inicialmente descritos como espécies de bacilos anaeróbios que apresentavam esporos ovais terminais, foram chamados pela comunidade científica alemã como “Kipfchenbakterien”, termo já utilizado por Escherich anteriormente ao descrever bacilos similares.

Prevot (1966) classificou as espécies *Clostridium* na ordem *Clostridiales* que contava com aproximadamente 100 espécies. Em 1974, o gênero *Clostridium* foi incluído na Família *Bacillaceae* cujas espécies foram subdivididas em quatro grupos; *Clostridium difficile* encontrava-se no segundo grupo desta classificação.

Johnson e Francis (1975) avaliaram 56 espécies de *Clostridium* pela homologia de rRNA, sendo divididas em quatro grupos: I, II, III e IV, os quais foram definidos pela porcentagens de guanina e citosina que possuíam em seu DNA.

Na Primeira edição do Manual de Sistemática Bacteriológica espécies do gênero *Clostridium* foram agrupadas segundo suas características fenotípicas, assim como por suas propriedades metabólicas na produção de ácidos, digestão de proteínas e hidrólise de amido (CATO; GEORGE; FINEGOLD, 1986).

Posteriormente, Collins et al. (1994), avaliando as sequências de gene 16S rRNA de 34 cepas de *Clostridium* concluíram que estas eram muito heterogêneas e que poderiam estar filogeneticamente mais próximas de outros gêneros bacterianos. Já Delost (1997), dividiu o gênero *Clostridium* em cinco grupos sendo que *C. difficile* foi localizado no grupo IV; esta classificação baseou-se na patogenia que estas espécies causavam. Stackebandt et al. (1999) analisaram as sequências de gene 16S rRNA de 146 espécies de *Clostridium* classificando-as em 18 grupos.

A grande diversidade filogenética do gênero *Clostridium*, demonstrado por Collins et al. (1994), tem levado à reclassificação de algumas espécies em novos ou outros gêneros já existentes. No entanto, novas espécies continuam sendo reclassificadas na Família *Clostridiaceae*.

O gênero *Clostridium* é classificado no filo *Firmicutes* o qual está dividido em três classes: *Bacilli*, *Clostridia* e *Erysipelotrichia*. A ordem dos *Clostridiales* pertence à classe II de *Clostridia*, esta ordem por sua vez alberga a Família *Clostridiaceae* que é constituída por 13 gêneros (RAINEY, 2010).

2.3.1 Patogênese de *Clostridium difficile* toxigênico

Os primeiros relatos sobre a toxicidade de espécies *C. difficile* em mamíferos remontam a 1969, quando ratos livres de germes foram inoculados com cepas puras desta espécie observando-se diarreia e alterações histo-morfológicas do ceco (HAMMARSTROM et al., 1969). Mais tarde, Tedesco e Alpers (1974) reportaram a

possível associação da doença conhecida como colite pseudomembranosa (PMC) ao uso de antimicrobianos.

A associação entre PMC e *Clostridium difficile* obteve-se através da administração de clindamicina em hamsters; fluídos obtidos do ceco dos animais doentes foram inoculados em outros sadios verificando-se o desenvolvimento da doença inflamatória. Assim, determinou-se a transmissibilidade da enterocolite por cepas *C. difficile* (BARTLETT et al., 1977).

O mecanismo pelo qual esta bactéria se aderiu à mucosa intestinal envolvia a presença de cápsula e fímbrias, enquanto que, o acúmulo de fluídos era provocado pela produção da toxina A (BORRIELLO, 1990). Posteriormente, foi demonstrado que o processo infeccioso era desencadeado pelo desequilíbrio da microbiota intestinal residente e subsequente proliferação de espécies *C. difficile*, além de ficar estabelecida a origem não zoonótica destas infecções (BRAZIER, 1998).

A espécie *C. difficile* tem como veículo de patogenicidade duas exotoxinas de origem protéica: toxina A e toxina B. Assim, Rolfe e Finegold (1979), descreveram o aumento da permeabilidade vascular em coelhos ao inocular uma solução sobrenadante de cultura pura de *C. difficile* toxigênico nos mesmos, porém não conseguindo distinguir qual das toxinas causava tal efeito.

Inicialmente a toxina A foi considerada uma enterotoxina causadora de extravasamento e acúmulo de fluídos e a toxina B, que não causava o mesmo efeito, como uma possível citotoxina (BARTLETT et al., 1980). Assim, Lyster et al. (1982), analisando as atividades biológicas de ambas as toxinas em modelos experimentais de coelhos e camundongos evidenciaram o acúmulo de fluídos no intestino, o aumento da permeabilidade vascular e a aparição de lesões eritematosas e hemorrágicas. No entanto, observou-se neste estudo uma menor resposta por parte da toxina B no acúmulo de fluídos quando comparada com a atividade da toxina A, porém com uma maior letalidade.

Desta forma, embora ambas as toxinas possuam características citopatogênicas, a toxina B foi descrita como citotoxina, e a toxina A por causar um maior acúmulo de fluído entérico, como enterotoxina (AHLGREN et al., 1983; ROTHMAN et al., 1984; SULLIVAN; PELLET; WILKINS, 1982).

As espécies toxigênicas de *C. difficile* têm a propriedade em geral de sintetizar ao mesmo tempo as toxinas A e B, contrapondo-se às espécies não toxigênicas

incapazes de produzir qualquer uma delas. Os genes responsáveis pela produção de ambas as toxinas encontram-se no cromossomo bacteriano (BARROSO et al., 1990). No entanto, foi descritas algumas espécies que sintetizam apenas a toxina B, porém com atividade enterotoxigênica (BORRIELLO et al., 1992; SUN; SAVIDGE; FENG, 2010).

As toxinas A e B de *C. difficile* interagem com os receptores das células epiteliais do intestino sendo internalizadas e causando o desarranjo do citoesqueleto de actina o que inicia o processo diarreico no hospedeiro (EICHEL-STRIKER et al., 1996; VOTH; BALLARD, 2005).

A região cromossomal que abriga os genes *tcdA* (toxina A) e *tcdB* (toxina B), denominada PaLoc, também comporta os genes *tcdD*, *tcdE* e *tcdC*; no entanto, foi verificado que este locus apenas existe nas espécies toxigênicas (HUNDSBERGER et al., 1997). Desta forma, em estudo realizado por Spigaglia e Mastrantonio (2002), foram observados elevados níveis de expressão de TcdC durante a fase exponencial de crescimento de *C. difficile* e baixos níveis de expressão dos outros genes do PaLoc, fato que sugere o controle negativo dos toxigenes por parte de TcdC.

Por outro lado, também foi descrita a toxina binária (CdtA/CdtB) de *C. difficile* cujos genes *cdtA* (subunidade enzimática) e *cdtB* (subunidade de ligação), encontram-se fora de PaLoc. Esta toxina é considerada um fator adicional de virulência pelo seu efeito citotóxico (PERELLE et al., 1997; STUBBS et al., 2000).

Clostridium difficile conta com outros fatores de virulência como flagelos mediados pelo gene *fliC* que aumentam a aderência ao epitélio intestinal quando comparado às cepas não flageladas (TASTEYRE et al., 2000, 2001); e proteínas de superfície (SLP) localizadas na parede celular ou associadas à mesma por meio de adesinas também com função aderente (CALABI et al., 2001; WALIGORA et al., 2001).

Posteriormente, analisando a atividade biológica de TcdC, foi observado que uma deleção no gene *tcdC* (posição 18bp ou 117bp) poderia estar causando uma super-expressão das toxinas A e B (WARNY et al., 2005) fato que inativaria o regulador negativo das mesmas, e o que levaria a cepa *C. difficile* toxigênica 027/BI/NAP1 a expressar sua característica hipervirulenta (MACCANNELL et al., 2006).

2.3.2 Aspectos clínicos da infecção por *Clostridium difficile*

Sabe-se que populações de *C. difficile* habitam o trato gastrointestinal da criança recém nascida sem provocar em geral, alguma doença (VISCIDI; WILLEY; BARTLETT, 1981). Assim, *C. difficile* está presente em 10% a 70 % das fezes de crianças e em aproximadamente 5% nas fezes de adultos sadios (JANGI; LAMONT, 2010).

Clostridium difficile é frequentemente isolado de áreas hospitalares albergando indivíduos com diarreia, e das mãos do pessoal da saúde constituindo-se em importantes fontes de transmissão. Também, a sobrevivência de seus esporos deve ser considerada, pois permite sua permanência por períodos longos e o transporte para diferentes locais, sendo os próprios pacientes ou portadores assintomáticos os maiores reservatórios. (BEST et al., 2010; CLABOTS et al., 1992; KIM et al., 1981).

Por outro lado, a ocorrência de *C. difficile* em crianças com diarreia e sob tratamento antimicrobiano foi determinada por Gilligan, MacCarthy e Genta (1981), sugerindo a sua associação ao quadro diarréico. Assim, diversos estudos observaram a presença de *C. difficile* em crianças com diarreia e que estavam sob tratamento antimicrobiano (KLEIN et al., 2006; OGUZ et al., 2001; WILSON, 2006)

Desta forma, os recém nascidos podem contaminar-se diretamente do ambiente que os circundam ou pelo contato direto com o pessoal da área da saúde. No entanto, após um ano de idade as populações bacterianas residentes do intestino vão se estabelecendo e começam a se tornar similares à microbiota do adulto, diminuindo assim, as populações de *C. difficile* (AL-JUMAILI et al., 1984; STARK; LEE; PARSONAGE, 1982).

No Brasil, a associação da presença de *C. difficile* a processos diarréicos em crianças menores de um ano de idade que estavam utilizando antimicrobianos, foi observada por Garcia e Uzeda (1988) em 28,1% das amostras analisadas verificando que a ocorrência de *C. difficile* diminuía conforme a idade das crianças aumentava.

Estudos realizados com populações de *C. difficile* detectadas em indivíduos assintomáticos sugerem que a tolerância dos recém nascidos a estas espécies poderia ser atribuída a substâncias existentes no colostro materno inibindo a ação

das toxinas ou devido à ausência de receptores específicos para as enterotoxinas (KIM et al., 1984; LYERLY; KRYVAN; WILKINS, 1988).

McFarland et al. (1989), em estudo realizado em 428 pacientes hospitalizados, relataram que apenas 29 pacientes (7%) foram positivos para *C. difficile* no momento da admissão, e que dos 399 restantes, 83 pacientes (21%) adquiriram esta espécie durante a hospitalização. Entre os pacientes que adquiriram *C. difficile*, 52 pacientes (63%) permaneceram assintomáticos e 31 pacientes (37%) desenvolveram quadro diarréico. Cabe ressaltar que, entre os funcionários do hospital foi detectada esta espécie bacteriana em 59% das mãos, constituindo-se, portanto, em importante fonte de contaminação.

O uso de antimicrobianos em adultos e a terapia anti neoplásica têm aumentado o número de casos de doenças associadas ao *Clostridium difficile* (DACD), assim como tem aumentado os portadores assintomáticos destas espécies (ANAND; GLATT, 1993). A utilização de antimicrobianos pode desequilibrar a homeostase do trato gastrointestinal permitindo a proliferação de espécies *C. difficile* capaz de produzir as toxinas A e B. Portanto, as DACD são na maioria dos casos de caráter nosocomial (OWENS et al., 2008; REA et al., 2011)

Na clínica médica, considerando a existência de portadores assintomáticos, o simples isolamento de *C. difficile* não determina um diagnóstico de DACD definitivo, sendo necessário verificar a expressão das toxinas e sua toxicidade por cultura de células, para considerar esse microrganismo como potencialmente patogênico (BARTLETT, 1992, 2008).

Apesar da infecção por *C. difficile* estar, na maioria dos casos, limitada ao ambiente hospitalar, existem relatos que indicam a sua ocorrência fora do mesmo (KUIJPER et al., 2008; RILEY et al., 1991, 2010).

Estudos realizados em cultura de células em 1.234 adultos saudáveis, sem antibioticoterapia prévia de no mínimo 4 semanas, demonstraram a portabilidade de espécies *C. difficile* em 7,6% dos indivíduos analisados (KATO et al., 2001). Em estudo realizado na Suécia, 20% dos pacientes com DACD estavam relacionados à aquisição do quadro clínico fora do hospital, e deste grupo 98% tinham utilizado antimicrobianos antes da DACD se estabelecer (NOREN et al., 2004).

Diversos estudos que avaliaram a presença das toxinas de *C. difficile* em fezes de crianças na América Latina utilizando diferentes metodologias mostraram

uma prevalência de 6 a 8% destas espécies (FERREIRA et al., 2003; PINTO et al., 2003; TORRES et al., 2004). Já em alguns países como Argentina e Irã foram observados prevalências de 6,5% a 17% de adultos com DACD (BALASSIANO et al., 2012; SADEGHIFARD et al., 2005). Também, Garcia et al. (2007), observaram uma incidência de 3,7% de diarreia nosocomial das quais 52,6% foram finalmente diagnosticados como DACD.

Por fim, sugere-se que, o aumento das doenças associadas a *C. difficile* possa estar relacionado ao consumo de inibidores de bombas de prótons muito utilizadas em pacientes com problemas gástricos, como refluxo. Este tratamento é muito utilizado via endovenosa em pacientes hospitalizados por úlceras gástricas. Os inibidores de bombas de prótons ou PPIs poderiam estar permitindo uma maior sobrevivência de *C. difficile* e de suas toxinas pela diminuição da acidez gástrica levando a quadros de DACD. Esta possível associação entre PPIs e DACD seria restrita a pacientes internados sob tratamento antimicrobiano e de idade avançada (DIAL et al., 2005; HEIDELBAUGH et al., 2009; WILLIAMS, 2001).

2.4 Enteropatógenos: patogenia e aspectos clínicos

2.4.1 *Escherichia coli*

A espécie *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais versáteis e mais bem estudados na bacteriologia científica, além de ser exaustivamente utilizada na pesquisa médica no mundo inteiro. Esta bactéria foi identificada pela primeira vez, por Theodore Escherich em 1885 e recebeu o nome de *Bacillus coli comune*. No entanto, posteriormente foi renomeada como *Escherichia coli* em homenagem ao seu descobridor.

Diversos estudos ao longo dos anos 20 e 30 do século passado contribuíram com o conhecimento sobre este importante patógeno. Assim, pesquisadores alemães como, Adam e Goldschmidt, estudaram a presença e invasividade de uma variedade destas espécies na mucosa intestinal de crianças com gastroenterites. Contudo, é apenas nos anos 40 que se começa a sugerir que as diarreias humanas poderiam estar associadas a algum microrganismo residente do intestino com propriedades patogênicas. Assim, diversos relatos chamaram a atenção da

comunidade científica ao relacionar esta bactéria às gastroenterites e surtos diarreicos, particularmente em crianças (HOLZEL, 1974; JAMES, 1973).

O gênero *Escherichia* é composto por cinco espécies: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* e *E. blattae*. Destas cinco espécies, *E. coli* é a mais estudada e conta, desde 1984, com uma Coleção de Referência chamada de ECOR. Esta coleção alberga 72 cepas de origem humana e 16 de outros mamíferos, e têm contribuído decisivamente para o melhor entendimento da estrutura populacional e da evolução de *E. coli* (OCHMAN; SELANDER, 1984).

As espécies *E. coli* têm ampla distribuição na natureza, no solo, na água e fazendo parte de organismos vivos (plantas, animais e ser humano); ele é também um dos primeiros microrganismos a estabelecer residência no trato intestinal do ser humano logo após o nascimento.

A presença e a detecção de *E. coli* estão na maioria das vezes associadas às condições higiênico-sanitárias do meio ambiente onde se desenvolvem os seres humanos. Sendo de suma importância também, as condições nas quais são ingeridos os alimentos, já que por serem bactérias de origem fecal, estes coliformes merecem redobrada atenção, pois algumas espécies são causadoras de doenças intestinais no ser humano. Assim, espécies de *E. coli* estão intimamente associadas às infecções intestinais de adultos e crianças (NATARO; KAPER, 1998).

Scheutz e Strockbine (2010), localizam o gênero *Escherichia* na Família I *Enterobacteriaceae* da Ordem XIII *Enterobacteriales* que por sua vez pertence à Classe III *Gammaproteobacteria* do Filo XIV *Proteobacteria*

As doenças entéricas humanas causadas por espécies *E. coli* foram inicialmente agrupadas como *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e classificadas em patótipos que diferem pelo mecanismo de ação patogênico e por seus fatores de virulência, tais como: EPEC, ETEC, EAEC, EIEC, EHEC e DEAC (NATARO; KAPER, 1998).

A primeira variedade patogênica de *E. coli* a ser descrita na literatura, EPEC, foi relacionada à diarreia infantil no mundo inteiro. EPEC, além de ser sorotipado baseando-se nos fatores O:H, pode ser classificado em duas variantes: EPEC típica e atípica. A EPEC típica está relacionada às diarreias, principalmente nos países emergentes, enquanto que, a atípica é mais comumente observada nos países desenvolvidos (ROBINS-BROWNE, 1987; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

EPEC tem como mecanismo de ação a lesão A/E (*attaching and effacing*) que está representado pela ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), que também, codifica a proteína intimina (gene *eaeA*) que está associada ao processo de adesão às células epiteliais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Este patótipo é um dos microrganismos mais prevalentes associados à diarreia aguda infantil em países emergentes superando em alguns casos a incidência de Rotavírus (GOMES et al., 1991); assim, recentemente em países como Brasil e Perú, tem-se observado uma importante participação de EPEC como agente etiológico de diarreia em crianças (MORENO et al., 2010; OCHOA et al., 2011; RAHOUMA et al., 2011).

ETEC também se constitui como um dos patótipos mais importantes devido a sua capacidade de produzir a toxina termolábil (LT) e a toxina termoestável (ST). Essas espécies bacterianas estão relacionadas às diarreias graves ou severas, principalmente em crianças de nível socioeconômico baixo, e também, à diarreia do viajante, denominada assim por ser adquirida por indivíduos de países desenvolvidos, como Estados Unidos e Europa, que visitam o hemisfério sul e são contaminados por esta bactéria (NATARO; KAPER, 1998; QADRI et al., 2005).

As enterotoxinas LT e ST podem ser classificadas segundo sua atividade patogênica em humanos ou em animais. Dentre a enterotoxina LT é sabido que somente o tipo LT-1 é capaz de causar infecção intestinal em humanos, à diferença do tipo LT-2 que não produz diarreia e não tem sido observado em humanos (NATARO; KAPER, 1998).

Este patótipo constitui-se de grande importância por representar uma das mais comuns causas de diarreia infantil nos países emergentes. Assim, estudos em Bangladesh, Turquia, Perú e Brasil reportaram prevalências de 5,2% a 12% deste enteropatógeno entre as amostras diarreicas avaliadas (HARRIS et al., 2008; ISERI et al., 2011; MORENO et al., 2010; OCHOA et al., 2011; OZEROL et al., 2005).

O patótipo EIEC está intimamente relacionado com as espécies de *Shigella* por produzirem similares fatores de virulência envolvidos nos quadros de disenteria e colite inflamatória, principalmente em adultos e crianças acima de 2 anos de idade. Esta bactéria atravessa a barreira epitelial invadindo as células M e se internalizando em vacúolos que são usados para invadir células adjacentes sem se expor ao meio externo (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Os genes responsáveis pela invasão

bacteriana estão localizados em um plasmídeo de aproximadamente 220 Kb, denominado *virulence plasmid* (VP) onde uma região de 30 Kb codifica o sistema de secreção tipo III (TTSS) necessário para a invasão (PARSOT, 2005),

No Brasil, espécies EIEC não têm prevalência relevante entre as diarreias infecciosas, no entanto, seu poder patogênico está bem definido, sendo similar ao quadro patológico desenvolvido por *Shigella* spp. (BARRETO et al., 2006; LIEBCHEN et al., 2011; MORENO et al., 2010).

Como outro patógeno emergente, associado às diarreias, pode ser mencionado EAEC que inicia a colonização da mucosa intestinal pela sua aderência agregativa às células bacterianas, com consequente formação de biofilme e secreção de enterotoxinas, promovendo os processos inflamatórios, deformação das criptas epiteliais e aumento do esfolhamento celular da barreira epitelial (HUANG et al., 2006).

Nestas espécies o plasmídeo pAA codifica a produção de fímbrias agregativas I, II e III; ativador transcricional AggR, da toxina termoestável EAEC, e da proteína anti-agregativa denominada dispersina que aumenta a dispersão dessas bactérias na mucosa favorecendo assim, a infecção (VILLASECA et al., 2005; WEINTRAUB, 2007).

Atualmente, no Brasil, bactérias EAEC e EPEC representam os mais frequentes patótipos detectados em fezes de crianças com diarreia (BUERIS et al., 2007; LIEBCHEN et al., 2011; MORENO et al., 2010).

Bactérias EHEC estão associadas às diarreias em humanos, com características sanguinolentas, e estão também relacionados à síndrome hemolítica urêmica (HUS) (KARCH; TARR; BIELASZEWSKA, 2005). No entanto, no Brasil, a sua incidência é muito baixa em amostras clínicas provenientes de quadros diarreicos (LIEBCHEN et al., 2011).

Como principais fatores de virulência observam-se a produção de verocitotoxinas (Vts), pelo efeito citotóxico produzido em células Vero. EHEC também, produz a lesão A/E, caracterizada pela destruição das microvilosidades e a aderência às células epiteliais, assim, o gene que codifica a intimina (*eaeA*) é comum nos patótipos EHEC e EPEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Assim, em nível mundial, especialmente em países emergentes, incluindo o Brasil, estes microrganismos têm sido objetos de estudo por causarem quadros diarreicos em uma grande parcela de crianças menores de cinco anos de idade.

2.4.2 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*. No entanto, inicialmente a nomenclatura para este gênero obedecia dois sistemas, ao Código Internacional Bacteriológico garantida pela Comissão Judicial em Sistemática Bacteriológica, e a outro sistema independente proposto por Le Minor e Popoff (1987), que não acompanhava as regras desse Código Internacional, mas que era amplamente aceito por muitos pesquisadores.

Le Minor e Popoff (1987), observando a frequente confusão em denominar algumas espécies com nomes atribuídos a sorotipos, e propuseram a classificação dessa bactéria em gênero, espécie e subespécie, tal como *Salmonella enterica* subespécie *enterica*.

As sugestões de Le Minor e Popoff (1987), foram aprovadas pela Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes (2005), que considerou o gênero *Salmonella* dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a espécie *S. enterica* dividida em 6 subespécies, entre elas *S. enterica* subsp. *enterica*. Atualmente, esta nomenclatura é utilizada pelas principais organizações científicas e de saúde no mundo todo, assim como a World Health Organization.

A salmonelose é uma toxinfecção que geralmente provoca gastroenteritis agudas no homem e que está associada ao consumo de alimentos ou produtos de origem animal, como aves e ovos, ou ainda pelo simples contato com animais, águas e ambientes contaminados com bactérias do gênero *Salmonella* não pertencentes aos sorotipos Thypi ou Paratyphi.

Existem ao redor de 2.500 sorotipos de *Salmonella* identificados, dos quais aproximadamente 1.300 pertencem à subespécie *enterica*. Os sintomas mais comuns da salmonelose são: diarreia, vômito, dor abdominal e cefaléia após o consumo de alimentos contaminados. Esta síndrome costuma ser de natureza autolimitada com duração de 4 a 7 dias, e geralmente, não há necessidade de tratar

o doente com antibióticos; no entanto, indivíduos mais susceptíveis às complicações, como crianças menores de 5 anos, idosos, gestantes e imunocomprometidos, formam um grupo de risco bem definido onde a doença pode ser mais grave (WHO, 2005).

As infecções alimentares por *Salmonella* causam mais de 1,4 milhão de casos por ano apenas nos Estados Unidos resultando em mais de 168 mil consultas médicas, dentre as quais 580 mortes, com um gasto de aproximadamente de 3 bilhões de dólares/ano (WHO, 2005).

No Brasil, estudos realizados pelo Instituto Adolfo Lutz observaram um significativo aumento de casos por intoxicação devidos a *S. enterica*, assim, constatou-se um aumento de 1,2% a 64,9% no período de 1991 a 1995 estando a maioria destas associadas a surtos diarreicos (SÃO PAULO, 2011).

O quadro diarreico desenvolvido por esta infecção é de extrema gravidade quando crianças são atingidas. No Brasil, após o ano 2000 o Centro de Vigilância Sanitária em parceria com o Instituto Adolfo Lutz instaurou a Vigilância Ativa da *Salmonella* visando reduzir a morbidade e mortalidade por salmonelose (SÃO PAULO, 2011).

2.4.3 *Shigella* spp.

O gênero *Shigella* foi descrito nos seus primórdios como *Bacillus dysenteriae*, que embora claramente relacionado ao *Bacillus coli* (*Escherichia coli*) pela disenteria bacilar, tal relação não era reconhecida pelo fato de *E. coli* ser considerado um microrganismo comensal.

Em 1954, a Comissão da Associação Internacional de Microbiologistas propôs que a Família *Enterobacteriaceae* fosse dividida em nove grupos baseados em suas características fenotípicas e bioquímicas, mas ressaltando que estes não fossem considerados gêneros. Estes grupos eram: *Salmonella*, *Shigella*, *Arizona*, *Escherichia*, *Alkalescens-dispar*, *Klebsiella*, *Bethesda*, *Proteus* e *Providencia* (COWAN, 1956).

As primeiras observações sobre os efeitos patológicos desta bactéria foram feitas pelo médico e bacteriologista Kiyoshi Shiga, estudando um surto de disenteria com características sanguinolentas apelidada de “diarréia vermelha”. Shiga observou

que esse bacilo administrado em cães produzia diarreia. No entanto, o mais importante da descoberta foi à observação de fatores tóxicos, agora conhecidos como toxinas Shiga (TROFA et al., 1999).

Diversos estudos observam a elevada homologia entre espécies *E. coli* e *Shigella* spp. Desta forma, espécies EIEC que apresentam fatores de virulência comuns a *Shigella* spp. (gene *ipa*), e produzindo semelhantes sintomas no processo infeccioso, seriam mais estreitamente relacionados a estes patógenos do que com as espécies *E. coli* não toxigênicas (JOHNSON, 2000; PARSOT, 2005)

Atualmente, sabe-se que as quatro espécies pertencentes ao gênero *Shigella* (*Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, e *Shigella sonnei*) são geneticamente próximos das espécies *E. coli* pela sua elevada homologia de DNA, e pela parecida sintomatologia causada por elas no homem (PUPO; LAN; REEVES, 2000).

No mundo, estima-se que sejam ao redor de 120 milhões de episódios diarreicos sanguinolentos ocasionados por shigelose, resultando em mais de 1,1 milhão de mortes por ano dos quais 60% são crianças menores de 5 anos de idade. No Brasil, *Shigella* é detectada em diarreias infecciosas em crianças menores de 5 anos, conforme foi anteriormente relatado por Silva et al. (2008), ao avaliar uma população de 877 crianças e observando a prevalência de 5,1% deste patógeno. Em São Paulo, de 2% a 5 % das infecções diarreicas por alimentos ou águas contaminadas, reportadas pelo Centro de Vigilância Sanitária (CVG) por ano são devidas *Shigella* spp. sendo considerado ainda um problema de Saúde Pública (SÃO PAULO, 2003). Mais recentemente, Nunes et al. (2012) reportaram uma prevalência de 10,4 % em crianças com diarreia, principalmente em menores de 2 anos de idade.

2.4.4 *Yersinia enterocolitica*

Desde a Idade Média a Peste Bubônica ou Praga foi discutida por pensadores e filósofos atribuindo ou refutando a possibilidade da existência de pequenos seres capazes de produzir esta doença. Em 1671, Athanase Kircher, padre jesuíta, escreve em seu “Scrutinium Physico Medycum” sobre os pequenos seres animados invisíveis que causariam a peste. Já, Goiffon, em 1720, publica seu “Avertissement sur la Peste” onde fala sobre sua teoria dos germes e sua multiplicação. No entanto, assim

como Kircher, seus argumentos não se baseavam em provas visíveis (BROSSOLLET, 1973).

Bacteriologistas franceses como Astruc e Didier conseguiram estabelecer as bases dos germes patogênicos inoculando material contaminado em cães e observando a transmissibilidade da doença e seu efeito pestilento. Contudo, até o final do século XIX todos estes argumentos, observações e descrições sobre a Peste, finalmente entraram na história da bacteriologia como as epidemias que aconteciam no continente asiático (BROSSOLLET, 1973).

O bacilo da peste ou praga, como era conhecido, deve sua descoberta ao médico e bacteriologista francês Alexandre Yersin, pupilo de Louis Pasteur, que a pedido de seu governo se rende ao sul da China em 1894, durante uma epidemia e descreve pela primeira vez esta bactéria denominando-a de *Pasteurella pestis*. Yersin isola e cultiva este bacilo a partir de pacientes e do meio ambiente, observando diferentes variedades deste microrganismo, virulentos e não virulentos.

O Manual Bergey de Bacteriologia Determinativa em 1939, classificou o gênero *Pasteurella*, junto a *Brucella* e *Hemophilus*, como membros da Família *Parvobacteriaceae*. Posteriormente, Van Loghem (1944), descreveu algumas disparidades entre o bacilo da praga (*Pasteurella pestis*) e a espécie *Pasteurella avicida*, entre elas suas propriedades bioquímicas e antigênicas, assim como, o fenótipo das colônias, e propôs a sua reclassificação em um novo gênero denominado *Yersinia* que pertenceria à Família *Bacteriaceae*.

Posteriormente, diversas reuniões do Subcomitê Internacional em Taxonomia para *Pasteurella* e *Yersinia* se realizaram nas quais se designaram grupos de trabalho para estudar e definir as propriedades morfológicas, bioquímicas, antigênicas e imunológicas, além do poder patogênico das espécies avaliadas, e desta forma, poder estabelecer critérios sólidos de classificação.

Em 1969, o Subcomitê para *Pasteurella* e Organismos Relacionados endossou as propostas de Smith, Thal e Knapp de reclassificar e renomear às espécies *Pasteurella pestis* e *Pasteurella pseudotuberculosis* no gênero *Yersinia* com as designações *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis* (BURROWS et al., 1969), e sendo posteriormente incluído o gênero *Yersinia* na Família *Enterobacteriaceae* (MOLLARET; KNAPP, 1972).

O genero *Yersinia* é composto pelas espécies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* sendo todas as três patogênicas ao homem. Assim, *Yersinia enterocolitica* é considerado um importante patógeno transmitido por águas e alimentos contaminados. As enterocolites provocadas por esta espécie, principalmente em crianças, causam diarréias agudas, febre e dores abdominais (SÃO PAULO, 2003). Assim, alguns estudos no mundo, observaram prevalências deste enteropatógeno em crianças com diarréia de 1,1% a 7,5% (MINGRONE et al., 1987; MORRIS et al., 1991; OKWORI et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar quantitativamente espécies intestinais comumente envolvidas em processos diarreicos agudos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a presença de espécies de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicos e seus respectivos subtipos;
- b) determinar a presença de *Clostridium difficile* e seus respectivos toxinotipos;
- c) determinar a presença de enterobactérias tais como *Escherichia coli* enteropatógenicas (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroagregativa(EAEC), *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia enterocolitica*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras clínicas

Foram coletadas 260 amostras fecais de crianças, sendo 110 diarréicas e 150 não diarréicas. As crianças com diarréia foram atendidas no Hospital Municipal do Tatuapé, Hospital Infantil Cândido Fontoura, e Hospital Infantil Menino Jesus, São Paulo, SP. As crianças sem diarréia pertenceram ao Centro Educacional Unificado do Butantã (CEU Butantã), São Paulo, SP. Nenhuma das crianças recebeu antibióticos nos três meses anteriores às coletas das amostras clínicas, e não apresentavam doenças sistêmicas. Também, as faixas etárias dessas crianças variaram de 0 a 10 anos de idade, e foram selecionadas sem distinção de sexo e raça. Neste estudo uma única amostra fecal por criança foi coletada.

Foi considerado processos de diarréia aguda quando a criança apresentava mais de 3 evacuações líquidas ou semi-líquidas por dia e não sanguinolentas; apresentando ou não desidratação e vômitos; e febre.

Todas as amostras clínicas foram coletadas e transportadas em coletores plásticos e esterilizados, e foram processadas em um intervalo máximo de 4 horas. Os pais das crianças foram informados dos objetivos deste estudo, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos dos respectivos Hospitais e do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Proc. N° 743/CEP).

4.2 Detecção bacteriana: *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile* e enterobactérias

4.2.1 Extração do DNA bacteriano

Os DNA bacterianos foram extraídos diretamente das fezes utilizando-se o kit comercial DNA QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Todas as amostras de DNA obtidas foram avaliadas quanto a sua integridade por eletroforese em gel de agarose (1%) e mantidos a -80 °C, até seu uso.

4.2.2 Determinação da concentração do DNA bacteriano

A concentração dos DNA bacterianos foi determinada por espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640; $A_{260\text{ nm}} = 0,8$) correspondendo à concentração final de 1 ng.

4.2.3 Construção da curva-padrão para os ensaios de Real Time-PCR

Na determinação das curvas-padrão, foram usadas as cepas de referência: *Bacteroides fragilis* GAI 97124 (ETBF), *B. fragilis* VPI 13784 (subtipo 1), *B. fragilis* 86-5443-2-2 (subtipo 2), *B. fragilis* Korea 419 (subtipo 3), e *Clostridium difficile* VPI 10463, gentilmente cedidas pelo Dr. Sydney Finegold (Veterans Affairs L.A Medical Center, L.A, CA, USA), e *C. difficile* CDC (*cdtA*⁺/*cdtB*⁺, *tcdA*⁺/*tcdB*⁺) pela Dra. Lynne M. Sloan (Mayo Clinic, MA, USA). *Escherichia coli* enteropatogênica (*eaeA*⁺), *E. coli* enterotoxigênica (LT/STh⁺), *E. coli* enteroagregativa (*aggR*⁺), *Salmonella* spp. (*inv*⁺), *Shigella flexneri* (*ipaH*⁺), *Yersinia enterocolítica* (*ystA*⁺) e *Bifidobacterium bifidum* ATCC cedidas gentilmente pelos Drs. Roxane Piazza (Instituto Butantan), Juliana Pfrimer Falcão (Universidade de São Paulo de Riberão Preto) e Jacques R. Nicoli (Universidade Federal de Minas Gerais) .

Inicialmente, as bactérias foram crescidas em caldo BHI (90% N₂/10% CO₂, a 37 °C, por 48 horas) padronizadas pela escala 3 de McFarland (9 x 10⁸ células/mL). Foram realizadas diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻¹⁰) e semeadas em ágar sangue. Assim, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) correspondente em cada diluição foi determinado. De cada diluição, 1 mL foi centrifugado e o sedimento utilizado para a extração de DNA.

A inclinação da curva-padrão para cada DNA das cepas de referência foi calculada por regressão linear segundo as diluições seriadas para cada microrganismo pelo programa incorporado no sistema de detecção Rotor Gene 6000 (Rotor Gene Series Software 1.7). Em todas as reações de amplificação foram usados água ultra-pura MiliQ esterilizada e DNA de outro microrganismo como controles negativos. As curvas-padrão foram usadas para determinar os limites de detecção bacteriana e o número de cópias amplificado de DNA em cada uma das amostras fecais, com e sem diarreia (Figuras 2a, b e c).

4.2.4 Determinação qualitativa e quantitativa de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicos

4.2.4.1 Detecção e subtipagem qualitativa de ETBF e respectivos subtipos por multiplex PCR

A detecção do gene *bft* foi realizada segundo Pantosti et al. (1997) utilizando iniciadores espécies-específicos, enquanto a determinação dos diferentes subtipos de *B. fragilis* enterotoxigênicos foi realizada segundo Kato et al. (2000). Assim, foram misturados os iniciadores específicos GBF-201, GBF-312, GBF-322 e GBF-334 (Tabela 1) para detectar respectivamente os genes *bft-1*, *bft-2* e *bft-3*. Todas as reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µL, constituídos de 10 X tampão PCR, 50 mM de MgCl, 0,2 µM de dNTP, 0,4 µM de cada iniciador, 0,5 U de Platinum *Taq* polimerase, e 1 ng de DNA.

Em todas as reações de amplificação, H₂O Milli-Q esterilizada foi usada em vez de DNA como controle negativo. Todas as reações de amplificação de DNA foram realizadas em duplicata. O tamanho dos produtos amplificados indicativos da presença do gene *bft* foi de 294 pb e para cada subtipo foi: *bft-1* = 190 pb, *bft-2* = 175 pb, e *bft-3* = 285 pb.

Todas as reações de amplificação, tanto para o gene *bft* quanto para os subtipos gênicos, foram realizadas em termociclador GenAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Applied Biosystem) programado para 1 ciclo de 94 °C (5 minutos); 35 ciclos de 95 °C (30 segundos), 62 °C (30 segundos) e 72 °C (30 segundos); e 1 ciclo de 72 °C (5 minutos) para extensão final do DNA. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio, e fotografados em transiluminador UV (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak Digital Science).

Figura 2- Padronização da curvas-padrão para: (a) espécies *B. fragilis* enterotoxigênicos; (b) espécies *C. difficile*, e (c) *E. coli* enteropatogênico.

(a)

(b)

(c)

FONTE: Merino et al. (2011).

4.2.4.2 Detecção e subtipagem quantitativa de *ETBF* por Real Time-PCR

Os iniciadores e sondas espécies-específicos utilizados para a detecção do gene *bft* e seus respectivos subtipos: *bft-1*, *bft-2* e *bft-3* (Tabela 1), foram desenhados segundo a análise da sequência nucleotídica registrada no GenBank (National Center for Biotechnology Information-NCBI), e os mesmos, analisados com o programa NetPrimer (Premier Biosoft International) para verificar as melhores condições de amplificação de cada reação. Também, as suas respectivas especificidades foram analisadas pelos programas BLAST (National Center for Biotechnology Information-NCBI) e Primer Show (The Sequence Manipulation Suite-Bioinformatics Org).

As amplificações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Mort lake, New South Wales, Australia). As reações foram efetuadas em volumes finais de 25 µL contendo 2X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 100 µM de cada iniciador, 100 µM de cada sonda específica e 2 ng de DNA.

Para as reações de amplificação o termociclador foi programado para 1 ciclo de 95 °C (10 minutos), seguido de 40 ciclos a 95 °C (15 segundos) e 58 °C (1 minuto). Como controle negativo foi utilizado uma mistura de reação PCR TaqMan sem DNA.

4.2.5 Determinação quanlitativa e quantitativa de *Clostridium difficile*

4.2.5.1 Detrminação quantitativa de *C. difficile* por Real Time-PCR

Os iniciadores e sondas espécies-específicos utilizados para a detecção do gene 16S rRNA estão descritos na Tabela 2.

As amplificações de PCR em tempo real para a detecção desses genes foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett), e os ensaios efetuados em volumes finais de 25 µL contendo 2X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 100 µM de cada iniciador, 100 µM de sonda e 2 ng de DNA.

Para as amplificações o termociclador foi programado para: 1 ciclo de 95 °C (10 minutos); seguido de 40 ciclos a 95 °C (15 segundos) e 60 °C (1 minuto) para o gene 16S rRNA. Foi utilizado como controle negativo uma mistura de reação PCR TaqMan sem DNA.

4.2.5.2 Detecção qualitativa dos toxinotipos de *C. difficile* por multiplex PCR

Iniciadores espécies-específicos foram utilizados para a detecção dos genes *tcdA* e *tcdB* (Tabela 2). As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µL, constituídos de 10X tampão PCR, 50 mM de MgCl, 0,2 µM de dNTP, 0,4 µM de cada iniciador, 0,5 U de Platinum *Taq* polimerase, e 1 ng de DNA. Todas as reações foram realizadas em duplicata, e o tamanho dos produtos amplificados foram para *tcdA* = 1.217 pb e *tcdB* = 1.050 pb.

A amplificação foi realizada em termociclador GenAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystem) programado para: 1 ciclo de 94 °C (5 minutos); 37 ciclos de 94 °C (30 segundos), 50 °C (30 segundos) e 72 °C (30 segundos); e, 1 ciclo de 72 °C (5 minutos). Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio e fotografados em transiluminador UV (Kodak Digital Science).

4.2.6 Detecção quantitativa de enterobactérias e *Bifidobacterium* spp.

Foram utilizados iniciadores e sondas específicos para a detecção dos genes *eaeA* de EPEC/EHEC, LT e STh de ETEC, *aggR* de EAEC, *invA* de *Salmonella* spp., *ipaH* de *Shigella* spp./EIEC., e *ystA* de *Y. enterocolitica*, descritos na literatura (Tabela 3). Também, iniciadores e sonda específicos para o gene 16S rRNA para *Bifidobacterium* spp. foram utilizados.

As reações de amplificação do DNA foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett). Assim, esses ensaios foram realizados em volumes finais de 25 µL sendo 2X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) 100 µM de cada iniciador, 100 µM de sonda e 2 ng de DNA.

As condições de amplificação para as enterobactérias e *Bifidobacterium* spp. avaliadas estão descritas na Tabela 3. Em todas as reações, foram utilizados como controle negativo uma mistura de reação PCR TaqMan sem DNA.

4.3 Análise estatística

Os resultados obtidos no presente estudo foram avaliados pelo F test Mann-Whitney (GraphPad Prism Software Inc.). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 1- Sequências de iniciadores e sondas específicos utilizados na detecção de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicos e respectivos subtipos (*bft-1*, *bft-2*, *bft-3*) por Multiplex PCR e RT-PCR.

Genes	<div> <div>Iniciadores</div> <div>5' → 3'</div> </div>	Temperatura de Anelamento (°C)	Referência
PCR			
<i>bft</i>	F- GAC GGT GTA TGT GAT TTG TCT GAG AGA R- ATC CCT AAG ATT TTA TTA TCC CAA GT	52	Pantosti et al. (1997)
Multiplex-PCR			
<i>bft-1</i> , <i>bft-2</i> e <i>bft-3</i>	GBF201 –GAA CCT AAA ACG GTA TAT GT- GBF312 –CCT CTT TGG CGT CGC- GBF322 –CGC TCG GGC AAC TAT- GBF334 –TGT CCC AAG TTC CCC AG-	62	Kato et al. (2000)
RT-PCR			
(ETBF) <i>bft</i>	F- GGG ACA AGG GTT CTA CCA GCT TGA TA R- ATT CGG CAA TCT CAT TCA TCA TT P-CGCGAATTGGCCATCTCAGCTAGA	58	Presente estudo
Subtipo 1 <i>bft-1</i>	F- ATG ATG TCC TGG TTC A R- AAT TAA CCG TAT GCT CAG CG P- CTT CGG ATT TTT AAG CCA GTG TGA TGT C	58	Presente estudo
Subtipo 2 <i>bft-2</i>	F-ATG GTA CCT TCC AAC GGG R- GCG ATT CTA TAC ATG TTC TC P- CTT CGG ATT TTT AAG CCA GTG TGA TGT C	58	Presente estudo
Subtipo 3 <i>bft-3</i>	F- TTT GGG CGT ATC TTG GCT CA R- ATC ATC CGC AGG GTT AGC A P- CTT CGG ATT TTT TAG CCA GTG TGA TGT C	58	Presente estudo

FONTE: Merino et al. (2011)

Tabela 2- Sequências de iniciadores e sondas específicos utilizados na detecção de *C. difficile* (16S rRNA) por RT-PCR e das Toxina A (*tcdA*), Toxina B (*tcdB*) por Multiplex PCR.

Genes	Iniciadores		Temperatura de Anelamento (°C)	Referência
	5'	3'		
RT-PCR 16S rRNA	R-ATTCGGCAATCTCATTCATCATT F-GGGACAAGGATTCTACCAGCTTTATA P-CGCGAATTGGCGATCTCAGCTAGA		60	Penders et al. (2006)
Multiplex-PCR Toxinas A e B <i>tcdA/tcdB</i>	Tox A1 –GGA AAT TTA GCT GCA GCA TCT GAC- Tox A2 –TCT AGC AAA TTC GCT TGT GTT GAA- Tox B1 –GGT GAT ATG GAG GCA TCA CCA CTA G- Tox B2 –TCC AGG ATA AGT CTC CTC TAC GTT G-		50	McMillin et al. (1992)

FONTE: Merino et al. (2011).

Tabela 3- Sequências de iniciadores e sondas específicos utilizados na detecção de enterobactérias e *Bifidobacterium* spp., por RT-PCR.

Genes	Iniciadores		Condições de Amplificação	Referência
	5'	3'		
EPEC/EHEC (<i>eaeA</i>)	F - TGTGCTTTGTTTAATTCYGATAAGC R - GGAATCGGAGTATAGTTTACACCAA P – AGTCGAATCCTGGTGCGGC		1 ciclo: 95°C x 10 min 45 ciclos: 95°C x 15 seg 60°C x 60 seg	Iijima et al. (2007)
ETEC (LT)	F - AAGAGCGGCGCAACATTT R - CAATGGCTTTTTTTTGGGAGTCT P – AGGTCGAAGTCCCGGGCAGTCAA		1 ciclo: 95°C x 10 min 45 ciclos: 95°C x 15 seg 60°C x 60 seg	Iijima et al. (2007)
ETEC (STh)	F – AGAATCAGAACAAATATAAAGGGAAGTGT R - CCTGAAAGCATGAATAGTAGCAATTACT P – AGCACCCGGTACAAGCAGGATTACAACA		1 ciclo: 95°C x 10 min 45 ciclos: 95°C x 15 seg 60°C x 60 seg	Iijima et al. (2007)
EAEC (<i>aggR</i>)	F - ATGCCCTGATGATAATATACGGAATAT R- TCAGCATCAGCTACAATTATTCCTTT P – AAAAGTAGATGCTTGCAGTTGTCCGAATTGG		1 ciclo: 95°C x 10 min 45 ciclos: 95°C x 15 seg 60°C x 60 seg	Iijima et al. (2007)
Salmonella spp. (<i>invA</i>)	F - GCGTTCTGAACCTTTGGTAATAA R – CGTTCGGGCAATTCGTTA P - TGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCT		1 ciclo: 94°C x 1 min 45 ciclos: 95°C x 15 seg 60°C x 20 seg	Daum et al. (2002)
Shigella spp/EIEC. (<i>ipaH</i>)	F - CCTTTTCCGCGTTCCTTGA R – CGGAATCCGGAGGTATTGC P - CGCCTTTCCGATACCGTCTCTGCA		1 ciclo : 95°C x 10 min 45 ciclos: 95°C x 30 seg 60°C x 60 seg	Samosornsuk, et al. (2007)
Y. enterocolitica (<i>ystA</i>)	F - AATGCTGTCTTCATTTGGAGC R – ATCCCAATCACTACTGACTTC P - CAAGCAAGCTTGTGATCCTCCG		1 ciclo: 95°C x 15 min 45 ciclos: 94°C x 15 seg 60°C x 60 seg	Zheng et al. (2007)
Bifidobacterium (16S rRNA)	F - GCGTGCTTAACACATGCAAGTC R - CACCCGTTTCCAGGAGCTATT P - TCACGCATTACTCACCCGTTTCGCC		1 ciclo: 95°C x 10 min 40 ciclos: 95°C x 15 seg 60°C x 60 seg	Penders et al. (2006)

FONTE: Merino et al. (2011).

5 RESULTADOS

Das 110 crianças com diarreia e 150 sem diarreia, 48 (43,6%) e 56 (37,3%) respectivamente, foram positivas para a presença de pelo menos um dos microrganismos avaliados.

Utilizando-se as técnicas RT-PCR e Multiplex PCR observou-se que das 110 amostras diarreicas, 10 (9%) foram positivas para ETBF, e delas 9 pertenceram aos subtipos *bft-1* e uma ao subtipo *bft-3*. Na Tabela 4 pode ser notado que crianças com diarreia na faixa etária entre 12 e 23 meses de idade, apresentaram maior número de espécies enterotoxigênicas (7), e que a maioria pertenceu ao subtipo 1 (*bft-1*). Com relação as 150 amostras não diarreicas, em 7 delas foi detectada a presença do gene *bft*, correspondendo também, ao subtipo *bft-1* (Figura 3 e 4).

Figura 3- Detecção do gene *bft* por PCR.

Linha 1, controle positivo ETBF GAI 97124; linha 2, espécie *B. fragilis* enterotoxigênica (D20); linha 3 e 4, amostra clínica negativa para ETBF; linha 5, peso molecular 50 bp DNA ladder (Gene Ruler™)

FONTE: Merino et al. (2011).

Figura 4- Detecção do subtipo *bft-1* por Multiplex-PCR.

Linha 1, marcador de peso molecular 50 bp DNA ladder (Gene Ruler™); linha 2, espécie *B. fragilis* enterotoxigênica – subtipo *bft-1* (D92); linha 3, controle negativo (sem DNA); linha 4, controle positivo subtipo 1 *B. fragilis* VPI 13784; linhas 5, espécie *B. fragilis* não enterotoxigênico.

FONTE: Merino et al. (2011).

Com relação à espécie *C. difficile* foram identificadas como tais utilizando-se iniciadores e sondas espécies-específicos na reação de RT-PCR, sendo detectadas nas amostras fecais diarréicas 20 (18,1%) positivas para essa espécie e nas amostras não diarréicas 37 (24,6%) positivas (Figura 5).

Figura 5- Determinação da curva-padrão para *C. difficile* (a) e amplificação de DNA positivo para essa espécie (b).

(a)

(b)

FONTE: Merino et al. (2011).

Por outro lado, aplicando-se a técnica de Multiplex-PCR verificou-se que das amostras de fezes diarreicas positivas para *C. difficile*, somente em 6 (4,5%) delas foram detectadas o perfil toxigênico, sendo: *tcdA*+/*tcdB*- (4 amostras), *tcdA*+/*tcdB*+ (1 amostra) e *cdtA*+/*cdtB*+ (1 amostra), e que, das amostras não diarreicas, somente 10

(6,6%) foram toxigênicas, apresentando os seguintes perfis: *tcdA*+/*tcdB*- (3 amostras), *tcdA*-/*tcdB*+ (5 amostras) e *tcdA*+/*tcdB*+ (2 amostras) (Figura 6). Em nenhuma das amostras fecais não diarreicas, foi observada a toxina binária (*cdtA*+/*cdtB*+).

Figura 6- Detecção dos genes *tcdA* e *tcdB* de *C. difficile* por multiplex PCR.

Linha 1, cepa toxigênica *C. difficile* VPI 10463 (*tcdA*+/*tcdB*+); linhas 2 e 9, espécies *C. difficile* não toxigênicas; linhas 3, 4, 5 e 7 presença do gene *tcdA*; linha 8, presença do gene *tcdB*; linha 6, marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder (Fermentans).
 FONTE: Merino et al. (2011).

A distribuição de bactérias ETBF e *C. difficile* em ambas as amostras fecais, diarreicas e não diarreicas, em diferentes faixas etárias de crianças, esta expressa nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4- Distribuição da presença de espécies ETBF e dos subtipos em crianças com e sem diarreia em diferentes faixas etárias.

Espécie/ Idade	Crianças			
	Com Diarreia		Sem Diarreia	
	Nº	(%)	Nº	(%)
ETBF				
0-11 meses	3	(30)	1	(14,28)
12-23 meses	7	(70)	3	(42,85)
≥ 24 meses	0	0	3	(42,85)
Total	10	(100)	7	(100)
SUBTIPOS*				
Gene <i>bft-1</i>				
0-11 meses	3	(30)	1	(14,28)
12-23 meses	6	(60)	3	(42,85)
≥ 24 meses	0	0	3	(42,85)
Gene <i>bft-3</i>				
0-11 meses	0	0	0	0
12-23 meses	1	(10)	0	0
≥ 24 meses	0	0	0	0
Total	10	(100)	7	(100)

* Gene *bft-2* não foi detectado.
 FONTE: Merino et al. (2011)

Tabela 5- Distribuição da presença de *C. difficile* em crianças com e sem diarreia em diferentes faixas etárias.

Espécie/Idade	Crianças			
	Com Diarreia		Sem Diarreia	
	Nº	(%)	Nº	(%)
Toxigênico				
0-11 meses	2	(33,3)	4	(40)
12-23 meses	3	(50)	6	(60)
≥ 24 meses	1	(16,6)	0	0
Total	6	(100)	10	(100)
Não Toxigênico				
0-11 meses	6	(42,9)	15	(55,5)
12-23 meses	7	(50)	11	(40,7)
≥ 24 meses	1	(7,1)	1	(3,7)
Total	14	(100)	27	(100)

FONTE: Merino et al. (2011)

Nas reações de amplificação por RT-PCR, observou-se que o número de cópias do gene *bft-1* nas amostras diarreicas variou entre $1,2 \times 10^1$ e $2,25 \times 10^7$, e nas amostras não diarreicas entre $1,6 \times 10^2$ e $3,9 \times 10^5$. Uma única amostra fecal amplificou o gene *bft-3* apresentando 2×10^0 cópias.

As espécies *C. difficile* apresentaram intervalos correspondentes a $1,9 \times 10^1$ e $8,98 \times 10^6$ cópias do gene 16S rRNA nas amostras diarreicas, e 2×10^1 e $1,17 \times 10^8$ nas amostras não diarreicas.

Os intervalos com valores expressos em número de cópias de genes estão relacionados na Tabela 6.

Tabela 6- Análise quantitativa dos diferentes genes analisados em espécies ETBF e *C. difficile* de crianças com e sem diarreia.

Bactéria	Gene	Nº de amostras positivas (Nº cópias)		<i>p</i>
		Diarréicas (110)	Não Diarréicas (150)	
ETBF	<i>bft</i>	10 ($3,90 \times 10^0$)*	7 ($0,40 \times 10^1$)	
		$[2,71 \times 10^2 - 3,29 \times 10^7]**$	$[1,90 \times 10^2 - 1,29 \times 10^6]$	0.460
	<i>bft-1</i>	9 ($2,96 \times 10^0$)	7 ($3,77 \times 10^0$)	
		$[1,20 \times 10^1 - 2,25 \times 10^7]$	$[1,60 \times 10^2 - 3,90 \times 10^5]$	0.915
	<i>bft-3</i>	1 ($2,00 \times 10^0$)	0	-
<i>C. difficile</i>	16S rRNA	20 ($3,88 \times 10^0$)	37 ($4,80 \times 10^0$)	
		$[1,90 \times 10^1 - 8,98 \times 10^6]$	$[2,00 \times 10^1 - 1,17 \times 10^8]$	0.099

* Média de Nº cópias; ** Intervalo Nº de cópias.

FONTE: Merino et al. (2011)

A análise qualitativa para enterobactérias nas amostras fecais diarréicas mostrou que, 37 foram positivas para o gene *eaeA*, 6 para LT e 2 para STh, 30 para o gene *aggR*, 11 para o gene *ipaH*, 1 para o gene *invA* e 1 para o gene *ystA* (Tabela 7).

A distribuição geral dos enteropatógenos avaliados nas amostras fecais, diarréicas e não diarréicas, estão relacionadas na Figura 7.

Figura 7- Frequência de enteropatógenos em crianças com diarreia (110) e sem diarreia (150) avaliadas neste estudo.

FONTE: Merino et al. (2011).

Tabela 7- Distribuição de bactérias entéricas em crianças com (110) e sem (150) diarreia.

Bactéria/gene	Crianças				p
	Com Diarréia		Sem Diarréia		
	Nº	(%)	Nº	(%)	
EPEC/EHEC					
<i>eaeA</i>	37	(33,6)	21	(14)	< 0,001
ETEC					
LT	6	(5,4)	12	(8)	0,581
STh	2	(1,8)	3	(2)	1,000
EAEC					
<i>aggR</i>	30	(27,2)	40	(26,6)	1,000
Salmonella spp.					
<i>invA</i>	1	(0,9)	0	0	-
Shigella spp./EIEC					
<i>ipaH</i>	11	(10)	3	(2)	0,011
Y. enterocolitica					
<i>ystA</i>	1	(0,9)	0	0	-

FONTE: Merino et al. (2011).

A predominância de enteropatógenos detectados em crianças menores de 2 anos de idade, tanto nas amostras fecais diarreicas como não diarreicas, é observada na Tabela 8. Por outro lado, a distribuição dos mesmos como único patógeno detectado em ambos os grupos é observada na Figura 8.

Tabela 8- Distribuição de enteropatógenos por faixa etária em crianças com diarreia (110) e sem diarreia (150).

Bactérias	Crianças						
	Diarreicas			Não Diarreicas			p
	0-11m	12-23m	≥ 24m	0-11m	12 -23m	≥ 24m	
ETBF	3	7	0	1	3	3	-
<i>C. difficile</i>	8	10	2	19	17	1	0,425
EPEC/EHEC	17	19	1	10	10	1	0,900
EAEC	16	12	2	21	16	3	0,991
ETEC	4	4	0	7	5	0	-
<i>Shigella</i> spp./EIEC	6	4	1	0	1	2	-
<i>Salmonella</i> spp.	0	1	0	0	0	0	-
<i>Y. enterocolitica</i>	1	0	0	0	0	0	-
Total (%)	55 (50)	57 (51,8)	6 (5,4)	58 (38,6)	52(34,6)	10 (6,6)	0,524

FONTE: Merino et al. (2011).

Figura 8- Distribuição de enteropatógenos em 110 amostras fecais diarréicas (a) e 150 não diarréicas (b) em crianças, como único enteropatógeno.

(a)

(b)

FONTE: Merino et al. (2011).

Na Tabela 9 observa-se a análise quantitativa dos genes detectados para cada microrganismo entérico (EPEC/EHEC, ETEC, EAEC, *Salmonella* spp., *Shigella* spp./EIEC, *Y. enterocolítica* e *Bifidobacterium* spp.).

Tabela 9- Análise quantitativa dos diferentes genes detectados de bactérias entéricas presentes nas amostras fecais diarreicas (110) e não diarreicas (150) de crianças.

Bactéria	Gene	Nº de amostras positivas (Nº cópias)		<i>p</i>
		Diarreicas	Não Diarreicas	
EPEC / EHEC	<i>eaeA</i>	37 ($4,50 \times 10^2$) *	20 ($4,50 \times 10^1$)	0,048
		$[1 \times 10^0 - 2,44 \times 10^5]$ **	$[1 \times 10^0 - 3,28 \times 10^4]$	
ETEC	LT	6 ($1,05 \times 10^2$)	13 ($9,00 \times 10^0$)	0,334
		$[5 \times 10^0 - 6 \times 10^5]$	$[1 \times 10^0 - 3,90 \times 10^6]$	
	STh	2 ($1,47 \times 10^4$)	3 ($5,10 \times 10^5$)	
		$[8 \times 10^0 - 1,05 \times 10^6]$	$[1,1 \times 10^1 - 1,13 \times 10^6]$	
EAEC	<i>aggR</i>	30 ($2,50 \times 10^2$)	41 ($1,29 \times 10^3$)	0,348
		$[8,00 \times 10^0 - 1,05 \times 10^6]$	$[1,10 \times 10^0 - 1,13 \times 10^6]$	
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	1 ($7,9 \times 10^2$)	0	-
<i>Shigella</i> spp./EIEC	<i>ipaH</i>	12 ($2,79 \times 10^3$)	3 ($9,90 \times 10^0$)	0,002
		$[2 \times 10^0 - 1,30 \times 10^6]$	$[1,4 \times 10^1 - 1,07 \times 10^2]$	
<i>Y. enterocolítica</i>	<i>ystA</i>	1 ($1,22 \times 10^3$)	0	-
<i>Bifidobacterium</i> spp.	16S rRNA	110 ($1,85 \times 10^4$)	150 ($2,77 \times 10^4$)	< 0,001
		$[5,50 \times 10^1 - 8,31 \times 10^8]$	$[2,69 \times 10^2 - 1 \times 10^8]$	

* Média de Nº cópias; ** Intervalo Nº de cópias.

FONTE: Merino et al. (2011).

A técnica de RT-PCR mostrou-se sensível e específica para a detecção dos microrganismos avaliados pelo uso do sistema TaqMan. Assim, o número de cópias detectado para cada enteropatógeno de todas as amostras avaliadas, diarréicas e não diarréicas é mostrado na Figura 9.

Na Tabela 10 são observadas as associações bacterianas observadas nas 27 amostras fecais diarréicas e 34 não diarréicas.

Figura 9- Número de cópias detectadas por RT-PCR para um dos enteropatógenos avaliados em amostras fecais de crianças.

d= diarréicas; nd= não diarréicas.

FONTE: Merino et al. (2011).

Por outro lado, a Tabela 11 mostra a frequência de positividade para os enteropatógenos avaliados considerando-os como único patógeno detectado ou em associação com um ou mais patógenos.

Tabela 10- Associações bacterianas detectadas em amostras fecais diarréicas (110) e não diarréicas (150).

Associação Bacteriana	Amostra Fecal Positiva	
	Diarréicas	Não Diarréicas
EPEC* + EAEC	2	3
EPEC + ETBF	3	0
EPEC + <i>Shigella</i> spp.	3	0
EPEC + <i>Y. enterocolítica</i>	1	0
EPEC + EAEC + <i>C. diifficile</i>	6	3
EAEC + ETBF	2	0
EAEC + <i>C. difficile</i>	3	8
EAEC + ETBF + <i>C. difficile</i>	1	0
EAEC + <i>Shigella</i> spp.+ ETBF	1	0
EAEC + ETEC (STh) + ETBF	1	0
<i>Salmonella</i> spp. + EAEC + <i>C. difficile</i>	1	0
EPEC + <i>C. difficile</i>	2	5
EPEC + ETEC (STh) + <i>Shigella</i> spp.	1	0
EPEC + EAEC + ETBF	0	1
EPEC + EAEC + ETEC (LT)	0	2
EPEC + EAEC + ETEC (LT e STh)	0	1
ETEC (LT) + <i>C. difficile</i>	0	4
ETBF + <i>Shigella</i> spp.	0	1
EAEC + ETEC (LT)	0	3
EAEC + ETEC (LT) + <i>C. difficile</i>	0	2
EAEC + ETEC (LT) + ETBF	0	1
Total (%)	27 (24,5)	34 (22,6)

*EPEC/EHEC.

FONTE: Merino et al. (2011)

Tabela 11- Distribuição dos microrganismos avaliados nas fezes de crianças com (110) e sem (150) diarreia considerando sua presença como único potencial patógeno ou em associação com outros.

Bactérias	Amostras [Nº de patógenos]					
	Diarreicas			Não Diarreicas		
	[1]	[2]	[3]	[1]	[2]	[3]
ETBF	3**	5**	2**	4	1	2
<i>C. difficile</i> *	2	2	0	6	4	0
EPEC/EHEC	19	11	4	5	7	4
EAEC	13	10	2	18	12	5
ETEC	4	0	2	0	6	4
<i>Shigella</i> spp./EIEC	7	3	2	2	1	0
<i>Salmonella</i> spp.	0	1	0	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i>	0	1	0	0	0	0
Total (%)	48(43,6)	33 (30)	12 (10,9)	35 (23,3)	31 (20,6)	15 (10)

**C. difficile* toxigênico

**Número de amostras com um, dois ou três patógenos detectados.

FONTE: Merino et al. (2011).

6 DISCUSSÃO

Estudos microbiológicos da microbiota residente do trato gastrointestinal têm sido de importância na determinação de possíveis causas para produzir desequilíbrios fisiológicos no organismo humano. O estado de saúde no homem e animais esta determinado pela íntima associação entre microbiota residente e hospedeiro. O desequilíbrio dessa associação pode-se manifestar em desenvolvimento de processo infeccioso, produzindo no ecossistema intestinal o processo diarréico. Estudos têm mostrado que crianças menores de 5 anos de idade, indivíduos idosos e indivíduos com alterações imunológicas são frequentemente mais sensíveis a essas alterações intestinais (CHECKLEY et al., 2008; GUERRANT et al., 2002; PAWLOWSKI; WARREN; GUERRANT, 2009).

Relatos na literatura mostram que populações com baixo nível socioeconômico ou com limitadas condições de saneamento básico são frequentemente afetadas por processos diarréicos podendo ser de origem viral, bacteriano ou parasitário. Isto é agravado na maioria das vezes pela falta de uma política para a saúde em alguns países (AHS et al., 2010; FARTHING, 2000; FORSBERG et al., 2007).

Em nosso estudo, foram avaliados enteropatógenos anaeróbios estritos e facultativos sabidamente produtores de diarréia. Assim, foi observado que *B. fragilis* enterotoxigênico e *C. difficile* foram detectados tanto em crianças com diarréia como em crianças sem diarréia, e predominantemente na faixa etária entre 12 e 23 meses. Este resultado nos leva a sugerir que essa faixa etária pode ser considerada crítica no desenvolvimento da diarréia aguda produzida por essas bactérias anaeróbias.

Por outro lado, é importante lembrar que *Bacteroides fragilis* não enterotoxigênico e *C. difficile* fazem parte da microbiota residente intestinal humana. Como observado na Tabela 4 bactérias ETBF foram detectadas em 10 crianças com diarréia e em 7 sem diarréia, sendo importante notar que a maioria dessas bactérias foi subtipada como *bft-1*. Estudos têm mostrado a prevalência de diferentes subtipos em diferentes países, sugerindo-se que a prevalência de um determinado subtipo pode variar segundo a região geográfica e da etnia populacional (AKPINAR et al., 2010).

Estudos nacionais determinando a presença de bactérias ETBF têm mostrado, também, a predominância do subtipo 1 (BRESSANE; DURIGON; AVILA-CAMPOS, 2001; KRZYZANOWSKY; AVILA-CAMPOS, 2003). Isto, nos leva a sugerir que, ETBF subtipo 1 seria o mais prevalente em crianças brasileiras e que esta ocorrência vem aumentando gradativamente de forma alarmante.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que 9% das crianças menores de um ano de idade com diarreia aguda apresentaram bactérias ETBF, concordando com os dados observados na literatura que, sugerem a faixa etária de 1 a 5 anos de idade como a mais predisposta a abrigar essas espécies anaeróbias enterotoxigênicas (DURMAZ; DALGALAR; DURMAZ, 2005; PANTOSTI et al., 1997).

Embora bactérias ETBF tenham sido detectadas em fezes diarreicas e não diarreicas, as mesmas foram observadas como únicos agentes somente em 2/10 (diarreicas) e 4/7 (não diarreicas). Esses resultados concordam com o estudo de Akpinar et al. (2010), onde mostra uma baixa proporção (9%) desta bactéria como único agente em fezes diarreicas de crianças turcas.

É importante lembrar que, a maioria dos processos infecciosos produzidos por bactérias anaeróbias é de natureza mista, e certamente, no ecossistema intestinal, onde há uma enorme interação entre os microrganismos que compõem a microbiota residente, esta interação torna-se mais íntima podendo-se também sugerir que nesses processos, particularmente, nos diarreicos seja observada uma atividade microbiana sinérgica.

Por outro lado, os dados observados na literatura são concordantes com relação à predominância dos subtipos *bft-1* e *bft-3* (AKPINAR et al., 2010; CHUNG et al., 1999). Diferentemente em nosso estudo, o subtipo 2 não foi detectado, e o subtipo 3 foi observado em uma única amostra diarreica, diferentemente dos dados apresentados por Chung et al. (1999), que analisando fezes de crianças coreanas observaram uma elevada prevalência do subtipo 3.

As associações entre microrganismos são extremamente dinâmicas, e se considera que, estes estejam constantemente se adaptando ao meio que os abriga. Assim, estas interações microbianas podem ser simbióticas ou repulsivas que vão desde o estabelecimento de parcerias nutricionais bactéria-bactéria ou bactéria-hospedeiro, até associações infecciosas bactéria-bactéria, bactéria-parasita, ou

vírus-bactéria as quais causam doenças ao hospedeiro (CASADEVALL; PIROFSKI, 2000; MCCRACKEN; LORENZ, 2001; NEISH, 2009; PROBERT; GIBSON, 2002).

Nas amostras fecais analisadas neste estudo, foram também detectadas associações bacterianas, as quais produzem diversos fatores de virulência que de alguma forma podem participar no desenvolvimento do processo diarréico. Neste estudo foi avaliada a presença de enteropógenos comumente considerados como diarreiogênicos. Entretanto, a presença desses microrganismos em associação ou não, em crianças sem diarreia indica que a presença deles não representa necessariamente a capacidade de desenvolver o processo diarréico, podendo ser então, essas crianças consideradas como portadoras assintomáticas ou veículos de transmissão para outros indivíduos ou para o ambiente hospitalar (PERRON; QUESSY; BELL, 2008).

Clostridium difficile é considerado por representar risco de infecção hospitalar, podendo produzir o quadro clínico de diarreia associada a antibióticos. Existem alguns fatores tais como, a idade do indivíduo, a exposição às terapias antimicrobianas, e resposta imune, que podem determinar o aumento da população de *C. difficile*, que por sua vez poderá evoluir como um patógeno ou continuará como parte da microbiota intestinal residente de forma assintomática (JANGI; LAMONT, 2010; MCFARLAND, 2000).

Contudo, aproximadamente 3% dos portadores assintomáticos, na maioria crianças, podem carregar esporos desta bactéria potencialmente convertíveis à forma vegetativa e produzir toxinas devido ao desequilíbrio no ambiente intestinal (BARTLETT; PERL, 2005).

Da mesma forma *C. difficile* foi mais predominante em crianças entre 12 e 23 meses de idade (Tabela 5), entretanto, foi notado que a maioria dessas bactérias estava presente em fezes não diarréicas, mostrando a sua natureza residente na composição da microbiota intestinal.

Estudos nacionais têm mostrado a detecção dessa bactéria variando de 5,5% a 6,7% (FERREIRA et al., 2004; PINTO et al., 2003), sendo que neste estudo *C. difficile* foi detectado em 21,9% das amostras fecais avaliadas. Com isto, pode-se notar que, a prevalência desta espécie em fezes diarréicas e não diarréicas, particularmente em crianças, vem aumentando, sugerindo-se estudos frequentes

para acompanhar a participação desta importante bactéria na população infantil brasileira.

Por outro lado, quando se determinou o perfil toxigênico de *C. difficile* foi também observado o aumento dessas espécies (6,1%) em relação aos achados nacionais anteriormente relatados, variando entre 2,8% a 3,5%. Assim, no presente estudo pode-se verificar a predominância do tipo toxigênico *tcdA+/tcdB-* em 7 (12,3%) das amostras fecais, seguido de tipo *tcdA-/tcdB+* em 5 (8,8%), e de *tcdA+/tcdB+* em 3 (5,3%) amostras.

A baixa prevalência (1,7 %) de *C. difficile* toxigênico abrigando os genes para a toxina binária (*cdtA+/cdtB+*) pode ser justificado devido ao baixo número de bactérias detectado nas amostras fecais analisadas. Entretanto, Gonçalves et al. (2004), têm relatado uma elevada prevalência (10,3%) desta bactéria produzindo a toxina binária em amostras fecais de indivíduos adultos na França, sugerindo que esta alteração numérica seria também regulada por fatores como etnia, faixa etária e condição socioeconômica do paciente analisado.

Cabe ressaltar que, a única amostra de *C. difficile* possuindo os genes para a toxina binária não albergou os genes para a toxina A e B, e que segundo Rupnik (2001) a prevalência deste tipo bacteriano é considerada baixa (1,9%).

Similarmente ao observado com as bactérias ETBF as espécies toxigênicas de *C. difficile* foram detectadas em ambos os grupos diarreicos e não diarreicos, sugerindo também a colonização de portadores assintomáticos.

Segundo Jangi e Lamont (2010), crianças sem diarreia podem apresentar *C. difficile* toxigênicos (13%) e não toxigênicos (17%) na sua microbiota intestinal, permanecendo saudáveis e reforçando o estado de portador assintomático, entretanto, esses autores justificam esse estado clínico pelo aumento progressivo de anticorpos IgG e antitoxinas A e B, comumente observado em menores de um ano de idade.

Espécies de *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC) continuam sendo consideradas agentes etiológicos de grande importância na Saúde Pública. No Brasil, Bueris et al. (2007), descreveram uma prevalência de 25,4% para *E. coli* diarreiogênica em indivíduos com diarreia e de 18,7% no grupo não diarreico.

Em nosso estudo, essas bactérias foram detectadas em 57,3% nas fezes diarreicas e em 34% nas fezes não diarreicas, sendo valores maiores do que

aqueles relatados anteriormente por Almeida et al. (1998) e Bueris et al. (2007). Também, a nossa porcentagem de detecção foi maior daquela apresentada recentemente por Amisano et al. (2011) que relataram à presença dessas bactérias em 6,5% das amostras diarreicas. Esses autores sugerem que, a elevada prevalência de *E. coli* diarreiogênica seria observada em países emergentes.

Dentre as espécies diarreiogênicas é também destacada *E. coli* enteropatogênica (EPEC), sendo considerado por alguns autores como patótipo mais frequentemente associado às diarreias em crianças. Assim, estas espécies foram analisadas através da detecção do gene *eae* que caracteriza tanto EPEC (típica e atípica) quanto EHEC, detectando-se uma prevalência consideravelmente maior (33,6%) à observada por Barreto et al. (2006) de 10,8% e Moreno et al. (2010) de 11%.

Estudos também têm mostrado baixas prevalências de EPEC típicas (0,1% - 4,7%) em relação às atípicas, com a consequente emergência das últimas como patógenos associados às diarreias agudas. Esses autores descreveram prevalências para espécies EHEC/STEC que variaram de 0,5% a 0,8% entre as populações analisadas e que demonstra a baixa incidência deste patótipo no Brasil ou mesmo a ausência destas espécies (ARANDA; FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2004; BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2010; SOUZA et al., 2002).

Por outro lado, foi observada uma prevalência de EAEC em 27,2% das amostras fecais diarreicas e em 26,6% nas não diarreicas, o que concorda com estudo realizado anteriormente por Moreno et al. (2010) que reportou 25% de prevalência para esta espécie entre as crianças com diarreia. No entanto, cabe assinalar que nos últimos anos esta prevalência vem aumentando no Brasil conforme descrito por diversos autores (ARANDA et al., 2004; BARRETO et al., 2006; BUERIS et al., 2007).

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) também está associada aos processos diarreicos em crianças, e é considerada uma das principais causas de mortalidade infantil em países emergentes (WENNERAS; ERLING, 2004). No presente estudo, este patótipo foi detectado em 7,3% das amostras fecais diarreicas, concordando com a maioria dos estudos realizados no âmbito nacional (ALMEIDA et al., 1998; BUERIS et al., 2007; GOMES et al., 1991; SOUZA et al., 2002).

Pode-se notar que, em nosso estudo os genes de virulência dos respectivos patótipos de *E. coli* avaliados foram detectados tanto nas amostras diarréicas como não diarréicas, o que sugere a portabilidade assintomática de bactérias carregando estes genes em crianças sem diarreia. Por sua vez, Wenneras e Erling (2004) estimaram que, o estado portador de espécies patogênicas acontecia em pelo menos 50 milhões de crianças ao longo dos primeiros 4 anos de vida.

É de suma importância também, analisar as associações observadas entre *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e outros patógenos no processo infeccioso diarreico como se pode constatar na Tabela 10. EPEC e EAEC são as DEC mais comumente observadas nas associações bacterianas, descritas em nosso estudo em ambos os grupos de crianças analisadas.

Diversos estudos, no Brasil e no mundo, têm associado à presença de *Salmonella* spp. aos processos diarreicos em crianças e adultos (GRIMWOOD; FORBES, 2009; SOUZA et al., 2002). No Brasil, a prevalência deste enteropatógeno como causador de diarreias tem apresentado, nos últimos 20 anos, flutuações consideráveis. Assim, Osmo et al. (1982) observaram uma prevalência de 10,3%, e Gomes et al. (1991) de 7,6%; enquanto que, Almeida et al. (1998), Souza et al. (2002) observaram esta ocorrência entre 0,7% e 5,6%.

É importante ressaltar que, neste estudo somente em uma única amostra diarreica foi detectada *Salmonella* spp., à diferença de estudos que mostram a presença deste microrganismo variando de 2,7% a 85% em fezes diarreicas de crianças, não sendo observado em fezes normais, sugerindo uma participação efetiva no desenvolvimento da diarreia aguda (MORENO et al., 2010; SPANO et al., 2008).

A shigellose é considerada um dos processos infecciosos de elevada mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade no mundo inteiro (ASHKENAZI et al., 2004; NIYOGI, 2005). Embora, em nosso estudo, tenha sido detectado o gene *ipaH* que está presente nas espécies de *Shigella* spp. e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), o mesmo foi observado em 10% das amostras diarreicas e em 2% das nas diarreicas avaliadas neste estudo. Considerando-se a baixa prevalência das espécies EIEC nos processos diarreicos na população infantil brasileira, os dados deste estudo podem sugerir que espécies de *Shigella* possam ser os causadores

desses processos infecciosos (BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; LEAL et al., 1988; THIEM et al., 2004).

Entre as amostras positivas para *Shigella* spp. /EIEC, 90,1% pertenceram a crianças menores de 24 meses de idade. Esses resultados diferem daqueles estudos realizados em crianças da mesma faixa etária no Irã e na Indonésia, onde a prevalência dessas bactérias foi menor, variando de 9,1% a 12,8% (GHAEMI et al., 2007; HERWANA et al., 2010; MASHOUF; MOSHTAGHT; HASHEMI, 2006). Estudos americanos mostram a ausência desta bactéria em crianças de 0 a 3 anos de idade (VERNACCHIO et al., 2006). Assim, esses resultados reforçam a hipótese que a elevada prevalência dessa bactéria, estaria intimamente relacionada às condições sanitárias, socioeconômicas, e de políticas de Saneamento e Saúde dos países.

Yersinia enterocolitica foi detectada em apenas um caso diarreico em associação com EPEC. Esta observação verifica conjuntamente com os últimos estudos realizados no Brasil sobre a rara incidência deste enteropatógeno em diarreias de crianças menores de 5 anos de idade. Esta bactéria foi detectada por Souza et al. (2002) em apenas uma amostra diarreica, sendo que estudos posteriores não detectaram sua presença em processos diarreicos (BARRETO et al., 2006; MORENO et al., 2010).

Embora nossos resultados não mostrem diferença estatisticamente significativa ao avaliar, quantitativamente pela técnica de Real Time PCR, a maior parte dos agentes etiológicos diarreiogênicos entre os grupos estudados (Tabela 6 e 8), pode-se observar que para as espécies EPEC/EHEC e *Shigella* foram encontrados valores estatisticamente significantes entre os grupos diarreicos e não diarreicos.

Cabe ressaltar que, no presente trabalho detectou-se de forma quantitativa a presença de genes que codificam fatores de virulência. No entanto, a real expressão dos genes não foi verificada. Todas as amostras, diarreicas e não diarreicas, foram testadas para *Bifidobacterium* spp., sendo todas positivas, o que é reforçado e justificado pela natureza residente deste microrganismo no trato gastrointestinal. No presente estudo nem todas as amostras de DNA de fezes diarreicas apresentaram os genes avaliados. É importante lembrar que, a presença de rotavírus e adenovírus

não foi avaliada, assim como, outros possíveis agentes causadores de diarreia, tais como fungos e parasitas.

Deve ser destacado que, após a observação e análise de nossos resultados, deve ser considerado que a detecção e ou a quantificação dos genes, não implica necessariamente a sua expressão, o que vai depender notavelmente de outros fatores que participam da estabilidade do ecossistema intestinal humano.

Os dados obtidos em nosso estudo mostram a necessidade de avaliar continuamente a presença desses organismos causadores de diarreias não somente em crianças, mas também em pessoas idosas ou imunocomprometidas e em diferentes faixas etárias, permitindo desta forma obter dados microbiológicos mais completos e precisos que forneçam condições na clínica médica de diagnosticar e tratar de forma rápida esses processos diarreicos que acometem grupos populacionais de risco, particularmente, de países emergentes.

7 CONCLUSÃO

Após análise de nossos resultados, pode-se concluir que:

- a) *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicos e *Clostridium difficile* toxigênicos e não toxigênicos podem ser detectadas em crianças com e sem diarreia;
- b) *Escherichia coli* patótipos EPEC/EHEC e EAEC podem ser comumente detectadas em fezes diarreicas e não diarreicas; e que, *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* seriam observadas somente em fezes diarreicas;
- c) a maioria desses enteropatógenos pode estar presente em crianças com ou sem diarreia.

REFERÊNCIAS*

- AHLGREN, T. et al. Loss of surface fibronectin from human lung fibroblasts exposed to cytotoxin from *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, v. 39, n. 3, p. 1470-1472, 1983.
- AHS, J. W. et al. Diarrheal diseases in low and middle-income countries: incidence, prevention and management. **Open Infect. Dis. J.**, v. 4, p. 113-124, 2010.
- AKERLUND, T. et al. Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields in vitro of corresponding isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 353-358, 2006.
- AKPINAR, M. et al. Evaluation of the prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and the distribution *bft* gene subtypes in patients with diarrhea. **Anaerobe**, v. 16, p. 505-509, 2010.
- ALBERT, M. J. et al. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dakha, Bangladesh. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3458-3464, 1999.
- AL-GALLAS, N. et al. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 3, p. 571-582, 2007.
- ALI, T. et al. Long-term safety concerns with proton pump inhibitors. **Am. J. Med.**, v. 122, p. 896-8903, 2009.
- AL-JAROUSH, A. M. K.; EL JAROU, M. A.; EL QOUQA, I. A. Bacterial enteropathogens and risk factors associated with childhood diarrhea. **Indian J. Pediatr.**, v. 78, p. 165-170, 2011.
- AL-JUMAILI, I. J. et al. Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 19, p. 77-78, 1984.
- ALMEIDA, M. T. G. et al. Enteropatógenos associados com diarréia aguda em crianças. **J. Pediatr.**, v. 74, p. 291-298, 1998.
- AMISANO, G. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy. **New Microbiol.**, v. 34, p. 45-51, 2011.
- ANAND, A.; GLATT, A. E. *Clostridium difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, n. 1, 109-113, 1993.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANTUNES, E. N. F. et al. Pattern III non-toxigenic *Bacteroides fragilis* (NTBF) strains in Brazil. **Anaerobe**, v. 8, p. 17-22, 2002.

ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5849-5853, 2004.

ASHKENAZI, S. *Shigella* infections in children: new insights. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v.15, n. 4, p. 246-252, 2004.

AVILA-CAMPOS, M. J. et al. Determination of *bft* gene subtypes in *Bacteroides fragilis* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 1336-1338, 2007.

BAGER, P.; WOHLFAHRT, J.; WESTERGAARD, T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. **Clin. Exp. Allergy**, v. 38, n. 4, p. 634-642, 2008.

BALASSIANO, I. T. et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, p.249-255, 2010.

BALASSIANO, I. T. et al. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 169-179, 2012.

BARBUT, F. et al. Rapid diagnosis of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in diarrheal stools by real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 1276-1277, 2009.

BARRETO, M. L. et al. Community-based monitoring of diarrhea in urban Brazilian children: incidence and associated pathogens. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, p. 234-242, 2006.

BARROSO, L. A. et al. Nucleotid sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 13, p. 4004, 1990.

BARTLETT, J. G. et al. Clindamycin-associated colitis due to toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. **J. Infect. Dis.**, v. 136, n. 5, p. 701-705, 1977.

BARTLETT, J. G. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. **Rev. Infect. Dis.**, v. 1, p. 530-539, 1979.

BARTLETT, J. G. et al. Colitis induced by *Clostridium difficile*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 1, n. 2, p. 370-378, 1979.

BARTLETT, J. G. et al. Clinical and laboratory observations in *Clostridium difficile* colitis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 33, n. 11, p. 2521-2526, 1980.

BARTLETT, J. G. Antibiotic-associated diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15. p. 573-581, 1992.

BARTLETT, J. G.; PERL, T. M. The new *Clostridium difficile*- what does it mean?. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 2503-2505, 2005.

BARTLETT, J. G.; GERDING, D. N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. S12-18, 2008.

BEST, E. L. et al. The potential for airborne dispersal of *Clostridium difficile* fsymptomatic patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 50, n. 11, p. 1450-1457, 2010.

BISCHOFF, S. C. 'Gut health': a new objective in medicine?. **BMC Med.**, v. 9, p. 1-14, 2011.

BORRIELLO, S. P. et al. Molecular, immunological, and biological characterization of a Toxin A-negative, Toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 4192-4199, 1992.

BORRIELLO, S. P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection of the gut. **J. Med. Microbiol.**, v. 33, p. 207-215, 1990.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. **Microb. Infect.**, v. 1, n. 4, p. 323-333, 1999.

BRAZIER, J. S. Typing of *Clostridium difficile*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 7, p. 428-431, 2001.

BRESSANE, M. A.; DURIGON, L. E.; AVILA-CAMPOS, M. J. Prevalence of the *Bacteroides fragilis* group and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in immunodeficient children. **Anaerobe**, v. 7, p. 277-281, 2001.

BROSSOLLET, J. Les prépasteuriens à la recherché du bacilli de Yersin. Communication à la sceanse du 26 mai 1973. **Société Française d'Histoire de la Médecine**, 1973.

BRYAN F. L.; DOYLE M. P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **J. Food Prot.**, v. 58, p. 326-344, 1995.

BRAZIER, J. S. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 41, p. 47-57, 1998. Suppl.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

BURROWS, T. W. et al. Proposed activities of the subcommittee on *Pasteurella* and related organisms. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 19, n. 2, p. 157-158, 1969.

- CACERES, M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in children with diarrhoea in Nicaragua. **Anaerobe**, v. 6, p. 143-148, 2000.
- CALABI, E. et al. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1187-1199, 2001.
- CALDWELL, D. R.; KEENEY, M.; VAN SOEST, P. J. Effects of carbon dioxide on growth and maltose fermentation by *Bacteroides amylophilus*. **Jour. Bacteriol.**, v. 98, p. 668-676, 1969.
- CASEDEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogens interactions: basic concepts of microbial commensalisms, colonization, infection and disease. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 12, 6511-6518, 2000.
- CATO, E. P.; GEORGE, W. L.; FINEGOLD, S. M. Genus *Clostridium*. In: John G. Holt, **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p. 1141-1200.
- CHECKLEY, W. et al. Multi-country analysis effects of the diarrhoea on childhood stunting. **Int. J. Epidemiol.**, v. 37, p. 816-830, 2008.
- CHUNG, G. T. et al. Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4945-4949, 1999.
- CLABOTS, C. R. et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. **J. Infect. Dis.**, v. 166, n. 3, p. 561-567, 1992.
- CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - na emerging problem?. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 41, p. 93-98, 2001.
- COLLINS, M. D. et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, n. 4, p. 812-826, 1994.
- COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approach for modulating the microbial ecology of the gut. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 1052-1057, 1999.
- COWAN, S. T. Taxonomic ranks of *Enterobacteriaceae* 'groups'. **J. Gen. Microbiol.**, v. 15, p. 345-358, 1956.
- DAUM, L. T. et al. Real-Time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, p. 3050-3052, 2002.

DELOST, M. D. Anaerobes. In:_____. **Introduction to diagnostic microbiology**. St. Louis, Missouri: Mosby, 1997. p. 278-280.

DENEVE, C. et al. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 33, p. S24-S28, 2009.

DHAKAL, R. et al. Asymptomatic colonization of upper respiratory tract by potential bacterial pathogens. **Indian J. Pediatr.**, v. 77, p. 775-778, 2010.

DIAL, S. et al. Use of gastric-acid suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. **JAMA**, v. 294, n. 23, p. 2989-2995, 2005.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G. et al. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. **Gastroenterology**, v. 140, p. 1713-1719, 2011.

DONELLI, G.; FABRI, A.; FIORENTINI, C. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induce cytoskeletal changes and surface blebbing in HT-29 cells. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 113-119, 1996.

DURMAZ, B.; DALGALAR, M.; DURMAZ, R. Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with diarrhea: A controlled study. **Anaerobe**, v. 11, p. 318-321, 2005.

EICHEL-STRIKER, C. et al. Large clostridial cytotoxins – a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 375-382, 1996.

FALAGAS, M. E. et al. Unusual climatic conditions and infectious diseases: observations made by Hippocrates. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 28, n. 10, p. 716-718, 2010.

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

FALCÃO, J. P.; et al. Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersiniae* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. **J. Appl. Microbiol.**, v. 96, n. 6, p. 1230-1236, 2004.

FARTHING, M. J. G. Diarrhoea: a significant worldwide problem. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 14, n. 1, p. 65-69, 2000.

FERREIRA, C. E. A. et al. Prevalence of *Clostridium* spp., and *Clostridium difficile* in children with acute diarrhea in São Paulo city, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 451-454, 2004.

FORSBERG, B. C. et al. Diarrhoea case management in low- and middle- income countries, na unfinished agenda. **Bull. World Health Organ.**, v. 85, n. 1, p. 42-48, 2007.

FRANCO, A. A. et al. Cloning and characterization of the *Bacteroides fragilis* metalloprotease toxin gene. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1007-1013, 1997.

FRANCO, A. A. et al. Molecular evolution of the pathogenicity island of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 6623-6633, 1999.

FRANCO, A. A. et al. Modulation of bft expression by the *Bacteroides fragilis* pathogenicity island and its flanking region. **Mol. Microbiol.**, v. 45, p. 1067-1077, 2002.

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

GARCIA, C. et al. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Peruvian tertiary care hospital. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 5, p. 802-805, 2007.

GARCIA, L. B.; UZEDA, M. Ocorrência de *Clostridium difficile* nas fezes de crianças do Rio de Janeiro, RJ. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 30, n. 6, p. 419-425, 1988.

GHAEMI, E. O. et al. Epidemiology of *Shigella*-associated diarrhea in in Gorgan, north of Iran. **Saudi J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 3, p. 129-132, 2007.

GILIO, A. E. et al. Etiologia da diarréia aguda em crianças do sub-distrito do Butantã atendidas ambulatorialmente em hospital geral. **Pedritr.**, v. 13, p. 68-70, 1991.

GILLIGAN, P. H.; MACCARTHY L. R.; GENTA, V. M. Relative frequency of *Clostridium difficile* in patients with diarrheal disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 14, n. 1, p. 26-31, 1981.

GONÇALVES, C. et al. Prevalence and characterization of a binary toxin (Actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1933-1939, 2004.

GOMES, T. A. T. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 331-337, 1991.

GOMES, T. A. T. et al. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emer. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1851-1855, 2004.

GRIMWOOD, K.; FORBES, D. A. Acute and persistent diarrhea. **Pediatr. Clin. N. Am.**, v. 56, p. 1343-1361, 2009.

GUERRANT, R. L. et al. Magnitude and impact of diarrheal diseases. **Arch. Med. Res.**, v. 33, p. 351-355, 2002.

HACKER, J. et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol. Microbiol.**, v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.

HAMMARSTROM, S. et al. Autoantibodies to colon in germfree rats monocontaminated with *Clostridium difficile*. **J. Exp. Med.**, v. 129, n. 4, p. 747-756, 1969.

HARRIS, A. M. et al. Shifting prevalence of major diarrheal pathogens in patients seeking hospital care during floods 1998, 2004, and 2007 in Dhaka, Bangladesh. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 5, p. 708-714, 2008.

HEIDELBAUGH, J. J. et al. Adverse risk associated with proton pump inhibitors: a systematic review. **Gastroenterol. Hepatol.**, v. 5, p. 725-734, 2009.

HERWANA, E. et al. *Shigella*-associated diarrhea in children in South Jakarta, Indonesia. **South Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 41, n. 2, p. 418-425, 2010.

HOLZEL, A. Bray's discovery of pathogenic *Esch. coli* as a cause of infantile gastroenteritis. **Arch. Dis. Childhood**, v. 49, p. 668, 1974.

HOFTAD, T. Serological responses to antigens of *Bacteroidaceae*. **Microbiol. Rev.**, v. 43, p. 103-115, 1979.

HOLDEMAN, L. V.; MOORE, W. E. C. Gram-negative anaerobic bacteria. *In* **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8th ed. p. 384-404, 1974.

HOLTON, J. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 10, p. 99-104, 2008.

HONG, S. et al. Asymptomatic healthy slaughterhouse workers in South Korea carrying shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 56, p. 41-47, 2009.

HUANG, D. B. et al. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1303-1311, 2006.

HUNDSBERGER, T. et al. Transcription analyses of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. **Eur. J. Biochem.**, v. 244, p. 735-742, 1997.

HURLEY, B. W.; NGUYEN, C. C. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. **Arch. Intern. Med.**, v. 162, p. 2177-2184, 2002.

IJIMA, Y. et al. Evaluation of colony-based examinations of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool specimens: low probability of detection because of low concentrations, particularly during the early stage of gastroenteritis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 58, p. 303-308, 2007.

ISERI, L. et al. The prevalence of enterotoxigenic *E. coli* isolated from the stool of children aged 0-10 years with diarrhea in mid-Anatolia region, Turkey. **Braz. J. Microbiol.**, v. 42, p. 243-247, 2011.

JAMES, T. The story of the enteropathic *Escherichia coli*. **S. Afr. Med. J.**, v. 47, p. 1476-1480, 1973.

JANGI, S.; LAMONT, J. T. Asymptomatic colonization of *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. **JPGN**, v. 51, p. 2-7, 2010.

JOHNSON, J. L.; HARICH, B. Ribosomal ribonucleic acid homology among species of the genus *Bacteroides*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 71-79, 1986.

JOHNSON, J. L.; FRANCIS, B. S. Taxonomy of the Clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. **J. Gen. Microbiol.**, v. 88, p. 229-244, 1975.

JOHNSON, J. *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery?. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 583-585, 2000.

JOTWANI, R. et al. Pathogenicity of *Bacteroides fragilis* group in rat intra-abdominal abscesses. **Microbiol. Immunol.**, v. 36, n.10, p. 1041-1049, 1992.

Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 41, p. 185-187, 1991.

Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. The type species of the genus *Salmonella* Lignieris 1900 is *Salmonella entérica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Poffo 1987, with the type strain LT2, and conservation of the epithet *entérica* in *Salmonella entérica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, p. 519-520, 2005.

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

KARCH, H.; TARR, P. I.; BIELASZEWSKA, M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 295, p. 405-418, 2005.

KATO, N. et al. Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in children with diarrhea in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 801-803, 1999.

KATO, N. et al. A new subtype of the metalloprotease toxin gene and the incidence of the three *bft* subtypes among *Bacteroides fragilis* isolates in Japan. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 182, p. 171-176, 2000.

KATO, H. et al. Colonization and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 720-727, 2001.

KIM, K. H. et al. Isolation of *Clostridium difficile* from environment and contact of patients with antibiotic-associated colitis. **J. Infect. Dis.**, v. 143, n. 1, p. 42-50, 1981.

KIM, K. et al. In vitro and in vivo neutralizing activity of human colostrum and milk against purified toxins A and B of *Clostridium difficile*. **J. Infect. Dis.**, v. 150, n. 1, p. 57-62, 1984.

KINROS, J. M.; DARZI, A. W.; NICHOLSON, J. K. Gut microbiome-host interactions in health and disease. **Genome Med.**, v. 3, n. 3, p. 14, 2011.

KLEIN, E. J. et al. Diarrhea etiology in a children's hospital emergency department: a prospective cohort study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 807-813, 2006.

KLING, J. J. et al. Cloning and characterization of the gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 146, p. 279-284, 1997.

KOH, X. P. et al. Characterization of *Shigella sonnei* in Malaysia, an increasingly prevalent etiologic agent of local shigellosis cases. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, p. 122, 2012.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull. Health Organ.**, v. 81, p. 197-204, 2003.

KOTLOFF, K. L. et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull. World Health Organ.**, v. 77, p. 651-666, 1999.

KRIEG, N. R. et al. Phylum XIV *Bacteroidetes* phyl. nov. In: GOODFELLOW, M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed. New York: Springer, 2010. p. 25-467.

KRZYZANOWSKY, F.; AVILA-CAMPOS, M. J. Detection of non-enterotoxigenic and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples from children in São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 45, p. 225-227, 2003.

KUIJPER, E. J. et al. Spectrum of *Clostridium difficile* infections outside health care facilities. **CMAJ**, v. 179, n. 8, p. 747-748, 2008.

LANGLEY, J. M. et al. The Role of *Clostridium Difficile* and viruses as causes of nosocomial diarrhea in children. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 23, p. 660-664, 2002.

LASSMANN, B. et al. Reemergence of anaerobic bacteremia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, p. 895-900, 2007.

LEAL, N. C. et al. Enteropatógenos detectados em crianças sadias em três comunidades de baixa renda, em Recife, estado de Pernambuco, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 153-159, 1988.

LEAL, N. C. et al. Frequência de enterobactérias patogênicas em processos diarreicos infantis na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 1475-479, 1998.

LE MINOR, L.; POPOFF, M. Y. Designation of *Salmonella entérica* SP. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 37, n. 4, p. 465-468, 1987.

LI, B. et al. Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in fecal *Escherichia coli* isolates from asymptomatic humans in China. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 6698-6700, 2010.

LIEBCHEN, A. et al. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from patients with diarrhea in São Paulo, Brazil: identification of intermediate virulence factors profiles by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 6, p. 2274-2278, 20011.

LIM, M. L.; WALLACE, M. R. Infectious diarrhea in history. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 18, n. 2, p. 261-274, 2004.

LING, J. J. et al. Cloning and characterization of the gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 146, p. 279-284, 1997.

LYERLY, D. M. et al. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, v. 35, n. 3, p. 1147-1150, 1982.

LYERLY, D. M.; KRYVAN, H. C.; WILKINS, T. D. *Clostridium difficile*: disease and toxins. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 1-18, 1988.

MACCANNELL, D. R. et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR rybotype 027 isolates from eastern and western Canada. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 2147-2152, 2006.

MACY, J. M. The biology of gastrointestinal *Bacteroides*. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 33, p. 561-594, 1979.

MAGALHAES, J. G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S. E. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. **Semin. Immunol.**, v. 19, n. 2, p. 106-115, 2007.

MARCUS, S. L. et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 145-156, 2000.

MASHOUF, R. Y.; MOSHTAGHT, A. A.; HASHEMI, S. H. Epidemiology of *Shigella* species isolated from diarrheal children and drawing their antibiotic resistant pattern. **Iran. J. Clin. Infect. Dis.**, v. 1, n. 3, p. 149-155, 2006.

MATHERS, C. et al. **Global burden of disease in 2002**: data sources, methods and results. Geneva: World Health Organization, 2003.

MCCLARREN, R. L.; LYNCH, B.; NYAYAPATI, N. Acute infectious diarrhea. **Prim. Care**, v. 38, p. 539-564, 2011.

MCCRACKEN, V. J.; LORENZ, R. G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. **Cel. Microbiol.**, v. 3, p. 1-11, 2001.

MCFARLAND, L. V. et al. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, p. 204-210, 1989.

MCFARLAND, L. V.; BRANDMARKER, S. A.; GUANDALINI, S. Pediatric *Clostridium difficile*: A phantom menace or clinical reality?. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 31, p. 220-231, 2000.

MCMILLIN, D. E.; MULDROW, L. L.; LAGGETTE, S. J. Simultaneous detection of toxin A and toxin B genetic determinants of *Clostridium difficile* using the multiplex polymerase chain reaction. **Can. J. Microbiol.**, v. 38, p. 81-83, 1992.

MEDEIROS, M. I. C. et al. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirao Preto-SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 43, p. 21-24, 2001.

MELLI, L. C. F. L.; WALDMAN, E. A. Temporal trends and inequality in under-5 mortality from diarrhea. **J. Pediatr.**, v. 85, p. 21-27, 2009.

MENARD, R.; SANSONNETI, P. J.; PARSOT, C. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines *ipaB*, *ipaC*, and *ipaD* as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 18, p. 5899-5806, 1993.

MERINO, V. R. C. et al. Quantitative detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* subtypes Isolated from children with and without diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 416-418, 2011.

MINGRONE, M. G. et al. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from children with diarrhea in Italy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 7, p. 1301-1304, 1987.

MIRANDA, K. R. et al. Enterotoxigenic and nontoxigenic *Bacteroides fragilis* strains isolated in Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 734-735, 2008.

MOLLARET, H. H.; KNAPP, W. International committee on systematic bacteriology, subcommittee on the taxonomy of *Pasteurella*, *Yersinia* and *Francisella*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 22, n. 4, p. 401, 1972.

MONCRIEF, J. S. et al. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 1, p. 171-181, 1995.

MONCRIEF, J. S. et al. Molecular characterization of the fragilysin pathogenicity islet of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1735-1739, 1998.

MORRIS, J. G. et al. *Yersinia enterocolitica* isolated from two cohorts of young children in Santiago, Chile, incidence of and lack correlation between illness and proposed virulence factors. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, 2784-2788, 1991.

MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V. New names and combinations in the genera *Bacteroides* Castellani and Chalmers, *Fusobacterium* Knorr, *Eubacterium* Prévot, *Propionibacterium* Delwich, and *Lactobacillus* Orla-Jensen. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 23, p. 69-74, 1973.

MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese Hawaiians. **Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 961-979, 1974.

MORENO, A. C. R. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, p.50-57, 2010.

MYERS, L. L. et al. *Bacteroides fragilis* a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. **Infect. Immun.**, v. 44, p. 241-244, 1984.

MYERS, L. L. et al. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in calves. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 1344-1347, 1985.

MYERS, L. L. et al. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 2330-2333, 1987.

NAKANO, V. et al. *bft* gene subtyping in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* isolated from children with acute diarrhea. **Anaerobe**, v. 13, p. 1-5, 2007.

NAMAVAR, F. et al. A study of the candidate virulence factors of *Bacteroides fragilis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 1431-1435, 1991.

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Blast: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

NEISH, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v. 136, p. 65-80, 2009.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. **J. Microbiol.**, v. 43, p. 133-143, 2005.

- NOREN, T. et al. Molecular epidemiology of hospital-associated and community-acquired *Clostridium difficile* infection in a Swedish county. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 8, p. 3635-3643, 2004.
- NUNES, R. M. C. M. et al. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. **J. Pediatr.**, v. 88, n. 2, p. 125-128, 2012.
- OBISO, R. J.; AZGHANI, A. O.; WILKINS, T. D. *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1431-1437, 1997.
- OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. **J. Bacteriol.**, v. 157, n. 2, p. 690-693, 1984.
- OCHOA, T. J. et al. Frecuencia y Patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños Peruanos con y sin diarrea. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica**, v. 28, p. 13-20, 2011.
- OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annu. Rev. Med.**, v. 52, p. 259-274, 2001.
- OGUZ, F. et al. The role of *Clostridium difficile* in childhood nosocomial diarrhea. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 33, n. 10, p. 731-733, 2001.
- OKWORI, A. E. J. et al. The prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* among diarrhea patients in Jos, Nigeria. **Afr. J. Biotech.**, v. 6, n. 8, p. 1031-1034, 2007.
- O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L. K. A Millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p. 125-136, 2005.
- OSMO, A. A. et al. Estudo etiológico de 252 casos de diarréia aguda internados no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. **Pediatr.**, v. 5, p. 175-183, 1983.
- OWENS, R. C. et al. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. S19-31, 2008. Suppl.
- OZEROL, I. H. et al. The prevalence and molecular typing of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic stools in Malatya, Turkey. **New Microbiol.**, v. 28, p. 237-243, 2005.
- PANTOSTI, A. et al. *Bacteroides fragilis* strains Express multiple capsular polysaccharides. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 7, p. 1850-1855, 1993.
- PANTOSTI, A. et al. Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 10, p. 2482-2486, 1997.

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

PATRICK, S. et al. Multiple inverted DNA repeats of *Bacteroides fragilis* that control polysaccharide antigen variation are similar to the *hin* region inverted repeats of *Salmonella typhimurium*. **Microbiology**, v. 149, p. 915-924, 2003.

PAWLOWSKI, S. W.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. **Gastroenterology**, v. 136, p. 1874-1886, 2009.

PEDRA, A. C. et al. Diarréia causada por *Shigella*-Aspectos clínicos e terapêuticos. **Pedriatria**, v. 17, p. 86-90, 1995.

PENDERS, J. et al. Factors influencing the composition of intestinal microflora in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, p. 511-521, 2006.

PENDERS, J. et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. **Gut**, v. 56, p. 661-667, 2007.

PERELLE, S. et al. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1402-1407, 1997.

PERRON, G. G.; QUESSY, S.; BELL, G. A reservoir of drug-resistant pathogenic bacteria in asymptomatic hosts. **Plos ONE**, v. 3, n. 11, p. e3749, 2008.

PETRI JR, W. A. et al. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 1277-1290, 2008.

PINTO, L. J. F. et al. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 1095-1099, 2003.

PREMIER BIOSOFT INTERNATIONAL-Premier Biosoft's Free Tools. NetPrimer. Disponível em: <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>>. Acesso em: 23 Jan. 2010.

PREVOT, A. R. ORDER CLOSTRIDIALES. In: PREVOT, A. R. **Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1966. p. 227-298.

PROBERT, H. M.; GIBSON, G. R. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, v. 3, p. 23-27, 2002.

PUPO, G. M.; LAN, R.; REEVES, P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **PNAS**, v. 97, n. 19, p. 10567-10572, 2000.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, 18, n. 3, p. 465-483, 2005.

RAHOUMA, A. et al. Enteric pathogens associated with childhood diarrhea in Tripoli-Lybia. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v. 84, p. 886-891, 2011.

RAINEY, F. A. Genus I. *Clostridium*. In: GOODFELOW, M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2010. p. 736-828.

REA, M. C. et al. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a modelo of a distal colon. **PNAS**, v. 108, p. 4639-4644, 2011.

REID, G. When microbe meets human. **Clin. Inf. Diseas.**, v. 39, p. 827-830, 2004.

RILEY, T. V. et al. Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. **Epidemiol. Infect.**, v. 107, p. 659-665, 1991.

RILEY, T. V. et al. Community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. S263-265, 1995. Suppl.

RILEY, T. V. From obscurity to 'superbug': the rise of *Clostridium difficile*. **Healthcare Infect.**, v. 15, 59-61, 2010.

ROBINS-BROWNE, R. M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Clin. Inf. Diseas.**, v. 9, p. 28-53, 1987.

ROLFE, R. D.; FINEGOLD, S. M. Purification and characterization of *Clostridium difficile* toxin. **Infect. Immun.**, v. 25, n. 1, p. 191-201, 1979.

ROSSIT, A. R. B. et al. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo state, Southheastern Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, p. 59-66, 2007.

ROTHMAN, S. W.; BROWN, J. E. Inhibition of membrane functions in intact HeLa cells by *Clostridium difficile* cytotoxic culture filtrates. **Curr. Microbiol.**, v. 6, p. 221-224, 1981.

ROTHMAN, S. W. et al. Differential cytotoxic effects of toxins A and B isolated from *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, v. 46, n. 2, p. 324-331, 1984.

RUPNIK, M. How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 7, p. 417-420, 2001.

RUPNIK, M.; GRABNAR, M.; GERIC, B. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. **Anaerobe**, v. 9, p. 289-294, 2003.

SACK, R. B. et al. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: epidemiologies studies of its role as a human diarrhoeal pathogen. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 10, p. 4-9, 1992.

SACK, R. B. et al. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi children with diarrhea: a controlled study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 960-963, 1994.

SADEGHIFARD, N. et al. Prevalence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients with nosocomial diarrhea. **Iranian J. Publ. Health**, v. 34, n. 4, p. 67-72, 2005.

SAIDI, R. F. et al. *Bacteroides fragilis* toxin rearranges the actin cytoskeleton of HT29/C1 cells without direct proteolysis of actin or decrease in F-actin content. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v. 37, p. 159-165, 1997.

SALYERS, A. A. *Bacteroides* of the human lower tract. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 38, p. 293-313, 1984.

SAMOSORNSUK, S. et al. Using Real-Time PCR to detect shigellosis: *ipaH* detection in Kaeng-Khoi District, Saraburi Province, Thailand. **Thammasat Int. J. Sci. Tech.**, v. 12, n. 1, p. 52-57, 2007.

SAN JOAQUIN, V. H. et al. Association of *Bacteroides fragilis* with childhood diarrhea. **Scand. J. Dis.**, v. 27, p. 211-215, 1995.

SANSONETTI, P. J.; KOPECKO, D. J.; FORMAL, S. B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. **Infect. Immun.**, v. 35, p. 852-860, 1982.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Doenças Transmitidas por Águas e Alimentos. *Salmonella* Enteritidis/Salmoneloses. **Informe-NET DTA, Centro de Vigilância Epidemiológica, Coordenadoria de Controle de Doenças**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2011.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Doenças Transmitidas por Águas e Alimentos *Shigella* spp./Shigueloses. **Informe-NET DTA, Centro de Vigilância Epidemiológica, Coordenadoria de Controle de Doenças**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Doenças Transmitidas por Águas e Alimentos. *Yersinia enterocolitica/Yersinia pseudotuberculosis*. **Informe-NET DTA, Centro de Vigilância Epidemiológica, Coordenadoria de Controle de Doenças**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia*. In: GOODFELOW, M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2010. p. 607-624.

SCHROEDER, N. S.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion and death by Type III secretion. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 134-156, 2008.

SCHWAN, C. et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induce formation of microtubule based protrusions and increases adherence of bacteria. **Plos Pathog.**, v. 5, p. 1-14, 2009.

SCHMIDT, M. A. LEeways: tales of EPEC, ATEC and AHEC. **Cell. Microbiol.**, v. 12, n. 11, p. 1544-1552, 2010.

SEARS, C. L. The toxin of *Bacteroides fragilis*. **Toxicon**, v. 39, p. 1737-1746, 2001.

SEARS, C. L. et al. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, p. 797-803, 2008.

SEARS, C. L. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, p. 349-369, 2009.

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 90, p. 859-904, 2010.

SHAH, H. N.; COLLINS, M. D. Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 39, p. 85-87, 1989.

SILVA, T. et al. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of *ipa* genes in na infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 731-733, 2008.

SINGH, I.; VIRDI, J. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1065-1068, 2004.

SIMON, G. L.; GORBACH, S. L. Intestinal flora in health and disease. **Gastroenterology**, v. 86, p. 174-193, 1984.

SONG, Y.; LIU, C.; FINEGOLD, S. M. Genus I. *Bacteroides*. In: GOODFELLOW, M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2010. p. 27-41.

SOUZA, E. C. et al. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **J. Pediatr.**, v. 78, p. 31-38, 2002.

SOUZA, T. B. et al. High prevalence of antimicrobial drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in asymptomatic children living in an urban slum. **J. Infect.**, v. 59, p. 247-251, 2009.

SOUZA DIAS, M. B. et al. Pseudo-outbreak of *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD) in a tertiary-care hospital. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 52, p. 133-137, 2010.

SPANO, L. C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherence *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. **J. Med Microbiol.**, v. 57, p. 359-383, 2008.

SPIGAGLIA, P.; MASTRANTONIO, P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 9, p. 3470-3475, 2002.

STACKEBRANDT, E. et al. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v. 24, p. 253-258, 1999.

STARK, P. L.; LEE, A.; PARSONAGE, B. D. Colonization of the large bowel by *Clostridium difficile* in healthy infants: quantitative study. **Infect. Immun.**, v. 35, n. 3, p. 895-899, 1982.

STUBBS, S. et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 86, p. 307-312, 2000.

SUAREZ, M.; RUSSMANN, H. Molecular mechanisms of *Salmonella* invasion: the type III secretion system of the pathogenicity island 1. **Int. Microbiol.**, v. 1, p. 197-204, 1998.

SULLIVAN, N. M.; PELLET, S.; WILKINS, T. D. Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, v. 35, n. 3, p. 1032-1040, 1982.

SUN, X.; SAVIDGE, T.; FENG, H. The enterotoxicity of *Clostridium difficile* toxins. **Toxins**, v. 2, p. 1848-1880, 2010.

SUSHRUT, J.; LAMONT, J. T. Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in Infantis: Implications for Disease in Later Life. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 51, p. 2-7, 2010.

TASTEYRE, A. et al. a *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. **Microbiology**, v. 146, p. 957-966, 2000.

TASTEYRE, A. et al. Role of Flic and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 7937-7940, 2001.

TEDESCO, F. J.; ALPERS, D. H. Pseudomembranous colitis. **West. J. Med.**, v. 121, p. 499-500. 1974.

THE SEQUENCE MANIPULATION SUITE-BIOINFORMATICS ORG. **PrimerShow**. Disponivel em: <<http://bioinformatics.org/sms/>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

TINDALL, B. J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, p. 521-524, 2005.

TORRES, J. F. et al. Prevalence of *Clostridium difficile* and its cytotoxin in infants in Mexico. **J. Clin. Microbiol.**, v. 20, p. 274-275, 1984.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TRAN, V. N. G.; SANSONETTI, P. J. Mechanism of *Shigella* entry into epithelial cells. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, p. 51-55, 1999.

TROFA, A. F. et al. Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 1303-1306, 1999.

TZIANABOS, A. O. et al. Structure-function relationships for polysaccharide-induced intra-abdominal abscesses. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 8, p. 3590-3593, 1994.

TZIANABOS, A. O.; KASPER, D. L.; ONDERDONK, A. B. Structure and function of *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharides: relationship to induction and prevention of abscesses. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. S132-140, 1995. Suppl. 2.

ULGER TOPRAK, N. et al. The distribution of the *bft* alleles among enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from stool specimens and extraintestinal sites. **Anaerobe**, v. 12, p. 71-74, 2006.

VANLOGHEM, J. J. The classification of the plague-bacillus. Antonie **Van Leeuwenhoek**, v. 10, n. 1-2, p. 15, 1944.

VELASCO, J. et al. Profiles of enteropathogens in asymptomatic children from indigenous communities of Mérida, Venezuela. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 5, p. 278-285, 2011.

VERNACCHIO, L. et al. Diarrhea in American infants and young children in the communitysetting: incidence, clinical presentation and microbiology. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, p. 2-7, 2006.

VILLASECA, J. M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 47, n. 3-4, p. 140-159, 2005.

VISCIDI, R.; WILLEY, S.; BARTLETT, J. G. Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. **Gastroenterology**, v. 81, n. 1, p. 5-9, 1981.

VOTH, D. E.; BALLARD, J. D. *Clostridium difficile* Toxins: mechanism of action and role in disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 247-263, 2005.

VU NGUYEN, T. et al. Diarrhea caused by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in children less than 5 years of age in Hanoi, Vietnam. **Anaerobe**, v. 11, p. 109-114, 2005.

- WALIGORA, A. J. et al. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesives properties. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 4, p. 2144-2153, 2001.
- WALLACE, T. C. et al. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. **Nutr. Rev.**, v. 69, n. 7, p. 392-403, 2011.
- WARNY, M. et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **Lancet**, v. 366, p. 1079-1084, 2005.
- WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 4-8, 2007.
- WENNERAS, C.; ERLING, V. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhea and carrier state in the developing world. **J. Health Popul. Nutr.**, v. 22, p. 370-382, 2004.
- WEXLER, H. M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 4, p. 593-621, 2007.
- WILLIAMS, C. Occurrence and significance of gastric colonization during acid-inhibitory therapy. **Best Pract. Res. Gastroenterol.**, v. 15, n. 3, p. 511-521, 2001.
- WILSON, M. E. *Clostridium difficile* and childhood diarrhea: cause, consequence, or confounder. **Clin. Infect. Dis.**, v. 443, p. 814-816, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoea**: why children are still dying and what can be done. Geneva: WHO, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO estimates of the cause of death in children**. Geneva: WHO, 2009.
- WU, S. et al. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 14979-14984, 1998.
- WU, S. et al. *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and secretase-dependent E-cadherin cleavage. **J. Cell Sci.**, v. 120, p. 1944-1952, 2007.
- ZHANG, G. et al. Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in adult patients with diarrhea and healthy controls. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 590-594, 1999.
- ZHENG, H. et al. Clinical isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* in China using Real-Time PCR and culture method. **Digestion**, v. 75, p. 199-204, 2007.

ANEXO – ARTIGO DE PERIÓDICO PUBLICADO

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2011, p. 416–419
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.01356-10
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No. 1

Quantitative Detection of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Subtypes Isolated from Children with and without Diarrhea[†]

V. R. C. Merino,¹ V. Nakano,¹ C. Liu,² Y. Song,² S. M. Finegold,^{2,3,4} and M. J. Avila-Campos^{1*}

Anaerobe Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil¹; VA Medical Center West Los Angeles, Los Angeles, California²; and Department of Medicine³ and Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics⁴, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California

Received 2 August 2010/Revised for modification 24 September 2010/Accepted 18 October 2010

A rapid real-time PCR (RT-PCR) approach was developed to detect the *hly* gene subtypes in *Bacteroides fragilis* isolated from fecal samples. DNA obtained from diarrhea (11) and nondiarrhea (50) samples was evaluated. Subtype 1 was observed in 9 (82%) diarrhea and 7 (14%) nondiarrhea samples. Subtype 2 was not detected in any DNA samples, and subtype 3 was observed in only 1 diarrhea sample. The presence of the *hly* gene did not show any statistically significant differences between the groups of children. This technique could be used to evaluate a possible correlation between disease and the presence of *B. fragilis* enterotoxin.

Bacteroides fragilis is considered to be the anaerobe most commonly isolated from human clinical infections and is also considered to be the most virulent species in the *Bacteroides fragilis* group (11).

Enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF) strains have been associated with diarrhea in young farm animals and humans (2, 9). The enterotoxigenic strains were also isolated at higher frequencies from patients with bacteremia and infections of different sites related to the lung, intestine, abscesses, and blood (1). However, several clinical studies demonstrated that 5 to 20% of the population in the world appear to carry these strains asymptotically (5, 10).

Several studies have shown an association between ETBF strains and human diarrheal disease, particularly in young children (7, 8, 13). ETBF strains produce a 20-kDa zinc metalloprotease toxin, EFT (*B. fragilis* toxin), of which there are three distinct subtypes (14). These enterotoxigenic strains produce different isolates of the enterotoxin, which are associated with the *hlyA*, *hlyB*, and *hlyC* genes (4, 6). These isolates display different potencies, as follows: EFT-2 > EFT-1 > EFT-3 (12, 14). In this study, a real-time PCR (RT-PCR) was developed to investigate the presence of these subtypes of the *B. fragilis* enterotoxin (*hly*) gene in stool samples.

DNA from fecal samples obtained from 110 children with diarrhea (54 boys and 56 girls) and from 150 children without diarrhea (71 boys and 79 girls) was obtained; all children were 1 month to 10 years old. None of the children was under antibiotic treatment for at least 3 months prior to sample collection. The Ethics Committee of the Instituto de Ciências Biomédicas at the University of São Paulo (process no. 743/CEP) approved this study. A nonpathogenic strain of *B. fragilis* ATCC 25285, was used as a negative control.

The *hly* sequence of *B. fragilis* retrieved from GenBank was

analyzed by multisequence alignment with CLUSTAL W. On the basis of the multisequence alignment analysis data, six primer pairs and three probes were designed (Table 1). Primers and probes were also analyzed with NetPrimer analysis software (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>). The specificities of the primers and probes were predicted by comparison to all available sequences by using the BLAST database search program (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), and primers were further tested by running the PCR with DNA samples from 10 type strains of *B. fragilis* group species and 3 reference strains representing three subtypes of ETBF. The DNA samples for PCR were obtained from approximately 200 mg of fresh stool by using a QIAamp DNA stool minikit (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at -80°C until use.

In order to detect the *hly* gene, a qualitative PCR was performed by using specific primers, according to the study by Panbati et al. (9), and in order to detect the *hly* gene subtypes, a multiplex PCR was performed by using specific primers, according to the study by Kato et al. (6). Real-time PCR assays were performed using a Robo Gene 6000 (Cobas Life Science, Moolah, New South Wales, Australia). All assays were carried out in duplicate and performed in a total volume of 25 µl containing 2 × TaqMan universal master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 100 µM each primer, 100 µM TaqMan probe, and 2 ng DNA. Amplifications were performed in a thermocycler programmed as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and 58°C for 1 min. The negative control used was a PCR TaqMan master mix without DNA. The primer/probe sets used are shown in Table 1. The standard curve was analyzed for each evaluated *hly* gene using the respective primer/probe set against a serial dilution of each bacterial DNA sample obtained from *B. fragilis* GAI 97124, *B. fragilis* VPI 13781 (*hlyA*), *B. fragilis* 86-5442-2-2 (*hlyB*), and *B. fragilis* Korea (*hlyC*), corresponding to 10⁻² to 10⁻⁷ CFU per µg of feces. DNA samples were obtained by using an EasyDNA kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Amplifications were adjusted using R² values of >0.900. A sample was considered positive for a target gene when the fluorescence emitted by the sample was at least 50%

*Corresponding author. Mailing address: Anaerobe Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Phone: 55-11-3091-7344. Fax: 55-11-3091-7334. E-mail: marciac@usp.br.

[†]Published ahead of print on 27 October 2010.

TABLE 1. Target genes and sequences of primer and probe sets used in real-time PCR^a

Gene	Primer sequence (5'→3')
<i>hlyE</i> (ETEF).....	F: 000 ACA ADO ATT CTACCAACCTTATA R: AAT CCG CAATCT CATTCA TCATT P: 000 AAT CCG CAATCC ATC AAGTAC A
<i>hlyA</i> subtyp+.....	F: 000 ATO TCG TCG TTC A R: AAT TAT CCG TAT CCG CAG CG P: CTT CCG ATT TTR AAO CCA CTO CCA TOT C
<i>hlyB</i> subtyp+.....	F: CTT ADO CAT ADO TTO CCG TO R: CCG ATT CEA TAC ADO TTC TC P: CTT CCG ATT TTR AAO CCA CTO CCA TOT C
<i>hlyB</i> subtyp+.....	F: TTT CCG CAT ADO TTO CCG CA R: ATC ATC CCG ADO TTC AAG A P: CTT CCG ATT TTR AAO CCA CTO CCA TOT C

^aThe annealing temperature used for all genes was 59°C, and all data were obtained in this study. F, forward primer; R, reverse primer; P, probe.

higher than the limit of detection previously established for the *hlyE* gene and 50% above the background fluorescence.

Mean values $\pm$ standard deviation (SD) were calculated for each bacterial subtype, and the Student's test was used. A $\log_{10}$ value for the copy number for each gene in each fecal sample was computed. A difference of P of <0.05 was considered statistically significant.

By using a conventional PCR and a multiplex PCR, DNA samples were positive for the *hly* genes. The developed RT-PCR was able to detect the target copy number and distinguish among the three different subtypes. An amplification signal was detected from the target genes in the reference strains which each carry a specific *hly* gene subtype, but was not detected in other reference strains tested (data not shown), showing that the PCR could specifically detect each *hly* subtype.

The number of positive samples and the target copy number of the *hly* genes are shown in Table 2. The *hlyE* gene was observed in 10 (9.1%) of 110 diarrhea samples with 9 of them subtyped as *hlyE* and 1 subtyped as *hlyE*-2. In addition, the *hlyE* gene was observed in 7 (4.7%) of 150 nondiarrhea samples, and all of them were subtyped as *hlyE*-2. No DNA sample harbored the subtype *hlyE*-2. The quantitative analysis of DNA obtained from diarrhea samples showed copy number values that ranged from $\log_{10}$ 2.4 to $\log_{10}$ 7.5 for the *hlyE* gene, from $\log_{10}$ 1.1 to $\log_{10}$ 7.3 for the *hlyE*-2 gene, and of $\log_{10}$ 0.94 for the *hlyE*-3 gene. For DNA obtained from nondiarrhea samples, the copy number values ranged from $\log_{10}$ 2.2 to $\log_{10}$ 6.1 for the *hlyE* gene and from $\log_{10}$ 2.2 to $\log_{10}$ 5.6 for the *hlyE*-2 gene. In all PCR amplifications, gene copy numbers ranged from $\log_{10}$ 1 to $\log_{10}$ 7. By using the specific primer/probe sets described here, detection limits of 12 copies for the *hlyE*-3 gene and 2 copies for the *hlyE*-2 gene were observed. These are various conflicting aspects about ETEC and human clinical disease. Some studies have shown that ETEC is present in the normal colonic microbiota of humans as well as in clinical infections (3, 11). Studies have shown *hlyE*-3 to be the predominant subtype, and to our knowledge, this is the first report showing a quantitative RT-PCR used for *hly* gene subtyping.

Some studies have been performed in Brazil that detected the *hlyE* gene in fecal DNA obtained from children with acute diarrhea, but this gene was not observed in DNA samples

TABLE 2. Quantitative analysis of the different *hly* genes among ETEC strains from diarrhea and nondiarrhea fecal samples

Target gene	No. of positive samples (range of $\log_{10}$ no. of copies [mean $\pm$ SD])		P value
	Diarrhea	Nondiarrhea	
<i>hlyE</i>	10 (2.4 to 7.5) (5.5 $\pm$ 1.8)	7 (2.2 to 6.1) (3.9 $\pm$ 1.3)	0.46
<i>hlyE</i> -2	9 (1.1 to 7.3) (3.7 $\pm$ 1.8)	7 (2.2 to 5.6) (3.8 $\pm$ 1.3)	0.91
<i>hlyE</i> -3	1 (0.94)	0	

obtained from normal feces (3, 7). Ulgez Toprak et al. (13) described the detection of *hlyE*-3 and *hlyE*-2 in the feces of colon cancer patients, normal feces, and extra-intestinal strains, and the *hlyE*-3 gene was more commonly detected than *hlyE*-2. In contrast, in this study, only one *hlyE*-3 gene and no *hlyE*-2 genes were detected. It was a real surprise because in different reports, the *hlyE*-2 gene was shown to be more common than the *hlyE*-3 gene.

The quantitative RT-PCR approach that we described provides a convenient, dependable, and rapid method to study the diversity of the presence of the *hly* subtypes and the significance of ETEC in clinical infections (1). Considering the gene copy number determined for each sample, no statistically significant value among both child groups was observed. However, it is also important to determine statistically significant differences and to better understand the true role of ETEC strains and *hly* gene subtypes as virulence factors. Additionally, since differences in detecting the three *hly* gene subtypes may be attributed not only to the types of clinical specimens but also to patient demographics, these results indicate the need for more studies to evaluate the role of each subtype in the pathogenesis of diarrhea in different hosts.

We thank Zulmira Alves de Souza for her technical support.

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant 07/00635-7.

REFERENCES

- Antônio-Oliveira, M. J., O. Miy, V. Song, B. O. Boriksen, and S. M. Finegold. 2006. Determination of *hly* gene subtypes in *Shigella flexneri* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 44:1534-1536.
- Travassos, B. A., L. E. Durigan, and B. J. Antônio-Oliveira. 2001. Prevalence of the *Shigella flexneri* group and enterotoxigenic *Shigella flexneri* in immunodeficient children. *Amaz. Rev.* 22:271-281.
- Oliveira, B., Q. Zhang, A. Wainman, and O. E. Nord. 2000. Prevalence and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Shigella flexneri* in children with diarrhea in Nicaragua. *Amaz. Rev.* 21:435-446.
- Priddy, A. A., L. M. Murphy, B. Trachsel, S. Wu, J. K. Kaper, and O. E. Nord. 1997. Cloning and characterization of the *Shigella flexneri* metalloprotease toxin gene. *Infect. Immun.* 65:1007-1013.
- Hata, M., H. Hata, K. Watanabe, and K. Ueno. 1994. Association of enterotoxigenic *Shigella flexneri* with bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 20:283-286.
- Hata, M., O. Miy, H. Hata, K. Watanabe, V. Tanaka, T. Yamamoto, K. Suzuki, and K. Ueno. 2000. A new subtype of the metalloprotease toxin gene and the incidence of the three *hly* subtypes among *Shigella flexneri* Japan. *FEBS Microbiol. Lett.* 186:171-176.
- Marques, M. J., and B. J. Antônio-Oliveira. 2003. Detection of non-enterotoxigenic and enterotoxigenic *Shigella flexneri* stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 45:225-227.
- Marques, M. J., A. I. Gomes, B. J. Antônio-Oliveira, R. O. Ferreira, and B. J. Antônio-Oliveira. 2007. *hly* gene subtyping in enterotoxigenic *Shigella flexneri* isolated from children with acute diarrhea. *Amaz. Rev.* 28:1-5.
- Benlailu, A., B. Bhatnagar, B. Pillay, B. O. Boriksen, and K. J. Anon. 1997. Detection of enterotoxigenic *Shigella flexneri* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35:2462-2466.
- San Jose, M., V. H. J. O. Grillo, O. Miy, and O. E. Nord. 1995. Association of *Shigella flexneri* with childhood diarrhea. *Scand. J. Infect. Dis.* 27:211-215.
- Seiler, J. A., A. B. O. Gomes, and B. J. Antônio-Oliveira. 1998. Characterization

- of the enterotoxin gene of *Shewanella putrefaciens* from different human sources, abstr. 3.106, p. 56. Abstr. 2nd World Congr. Anaerobic Bact. Infect. International Society of Anaerobic Bacteria, Boston, MA.
12. Shera, O. L. 2001. Toxin of *Shewanella putrefaciens* T-1 strain, pp.1737-1746.
 13. Unger, T., Spratt, M., D. Rylandson, A. Vogel, S. Chavkin, H. M. Shih, B. Et. Guliver, L. Et. Akita, T. Denshikova, T. Odenk, and G. Deyellin. 2006.
 14. The distribution of the *hly* alleles among enterotoxigenic *Shewanella putrefaciens* strains from stool specimens and extra-intestinal sites. *Anaerobe* 12:71-74.
 15. Wu, S., L. A. Dreyfus, A. O. Tatarovskiy, O. Hynish, and O. L. Shera. 2002. Diversity of the metalloprotease toxin produced by enterotoxigenic *Shewanella putrefaciens*. *Infect. Immun.* 70:2462-2471.