FERNANDA BATISTA DE ANDRADE

PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PCR *MULTIPLEX* PARA O
DIAGNÓSTICO DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA TÍPICA E
ATÍPICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan, para a obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2013

FERNANDA BATISTA DE ANDRADE

PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PCR *MULTIPLEX* PARA O
DIAGNÓSTICO DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA TÍPICA E
ATÍPICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

Versão original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Andrade, Fernanda Batista de.

Padronização e avaliação de PCR *multiplex* para o diagnóstico de *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica / Fernanda Batista de Andrade. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Caracterização molecular de fatores de virulência de *Escherichia coli* diarréioge.

Versão do título para o inglês: Standardization and evaluation of multiplex PCR for the diagnostic of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*.

1. *Escherichia coli* 2. Reação em Cadeia por Polimerase 3. Diagnóstico I. Elias Junior, Prof. Dr. Waldir Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0109/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a):   Fernanda Batista de Andrade.

Título da   Padronização e avaliação de PCR *multiplex* para o
diagnóstico de *Escherichia coli* enteroagregativa típica e
atípica.

Orientador(a):   Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 418/10 referente ao projeto intitulado: *“Padronização e avaliação de PCR multiplex para o diagnóstico de Escherichia coli enteroagregativa típica e atípica”* sob a responsabilidade de **Fernanda Batista de Andrade**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 21 de setembro de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo durante toda minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Junior pela excelente orientação, incentivo e confiança.

À Nivete Alves Batista, minha mãe sempre dedicada, companheira e carinhosa que sempre acreditou em mim e me deu todo o apoio em meus estudos e tenho certeza que estará sempre ao meu lado.

Ao Robert J.P. de Andrade, meu pai, super protetor, que com todo o seu amor, sempre quis me ver formada e continua me incentivando em continuar estudando.

Ao Cristiano R. C. Aguiar, meu companheiro, por toda a sua compreensão, admiração e incentivo.

Ao Jaime B. Fernandes, meu segundo pai, companheiro de sempre, amigo demais, dedicado, que também sempre me apoiou em meus estudos.

A todos os meus familiares principalmente a Barbara, Guilherme, Lucas, Sofia e Giane, pelo amor e carinho.

Aos colegas de laboratório, Afonso, Francielli, Claudia, Kamila, Fernando, Ludmila, Matilde, Demetria e Daniela Luz, pela ajuda sempre que necessária e as risadas que não foram poucas.

A Dr^a Roxane Piazza, por me permitir aprender ainda mais em seu laboratório.

A todos os alunos e funcionários do laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Ao apoio financeiro do Comitê de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP).

E por último, mas não menos importante a DEUS.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo Nº 2010/19515-2) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

RESUMO

ANDRADE, F. B. **Padronização e avaliação de PCR *multiplex* para o diagnóstico de *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica.** 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O patótipo de *Escherichia coli* diarreiogênica denominado *E. coli* enteroagregativa (EAEC) é definido pela expressão do padrão de adesão agregativo (AA) em células epiteliais cultivadas. A presença ou ausência do gene *aggR*, localizado no plasmídeo de virulência de EAEC, define as EAEC como típicas ou atípicas, respectivamente. O diagnóstico padrão para a classificação de EAEC consiste em evidenciar o padrão AA no teste de adesão em células epiteliais cultivadas. Entretanto este teste é dispendioso, demorado e necessita de infraestrutura específica. Técnicas moleculares de diagnóstico têm sido desenvolvidas como alternativas ao teste de adesão. Esses ensaios detectam principalmente marcadores plasmidiais, não diagnosticando EAEC atípicas. O presente estudo teve como objetivo a padronização de uma PCR *multiplex* para o diagnóstico molecular de EAEC típica e atípica. Inicialmente os genes cromossômicos *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU* foram avaliados quanto à especificidade e prevalência em EAEC. Todos foram específicos e *aaiA* e *aaiG* foram os mais prevalentes nos dois grupos de EAEC. Dessa forma, a PCR *multiplex* foi estabelecida incluindo esses dois genes em conjunto aos genes plasmidiais *aatA* e *aggR*. O teste foi padronizado com sucesso utilizando amostras protótipo de EAEC e seu limite de detecção foi de 125 ng de DNA purificado. Em seguida, a reação foi avaliada em uma coleção de 403 amostras de *E. coli* de origem fecal previamente classificadas como pertencentes aos patótipos de *E. coli* diarreiogênicas ou como não patogênicas. A técnica apresentou 94,8% de sensibilidade, 94,5% de especificidade, 74,3% de valor preditivo de teste positivo e 99,1% valor preditivo de teste negativo. Além disso, permitiu um acréscimo de 60% na detecção de EAEC atípica. Dessa forma, o teste desenvolvido mostrou-se uma ferramenta sensível e específica para o diagnóstico de EAEC típica e atípica a partir de colônias de *E. coli* isoladas na coprocultura.

Palavras-chave: Diarreia. *Escherichia coli* enteroagregativa. PCR *multiplex*. Diagnóstico.

ABSTRACT

ANDRADE, F. B. **Standardization and evaluation of multiplex PCR for diagnostic of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli***. 2013. 86 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The diarrheagenic *Escherichia coli* pathotype known as enteroaggregative *E. coli* (EAEC) is defined by the expression of the aggregative adherence pattern (AA) on cultured epithelial cells. The presence or absence of the *aggR* gene, located in the EAEC virulence plasmid, defines EAEC as typical or atypical, respectively. The gold standard diagnostic for EAEC is the observation of the AA pattern in adherence tests with cultured epithelial cells. However, this assay is expensive, time consuming and needs specific laboratory infrastructure. Molecular diagnostic assays have been developed as alternatives to the adherence tests. These tests detect plasmid markers not suitable for atypical EAEC diagnosis. The present study aimed the standardization of a multiplex PCR for the molecular diagnosis of typical and atypical EAEC. Initially the chromosomal genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* and *aaiU* were evaluated for specificity and prevalence in EAEC. All of them were specific and *aaiA/aaiG* were the most prevalent in both groups of EAEC. Thus, the multiplex PCR was established, including these two genes together with the plasmid genes *aatA* and *aggR*. The test was successfully standardized using prototype EAEC strains and its detection limit was 125 ng of purified DNA. Then, the reaction was evaluated in a collection of 403 strains of fecal *E. coli* previously classified as belonging to diarrheagenic *E. coli* pathotypes or as non-pathogenic. The technique presented 94.8% of sensitivity, 94.5% of specificity, 74.3% of positive predictive value and 99.1% of negative predictive value. Moreover, there was an increase of 60% in detecting atypical EAEC. Therefore, the test developed is a sensitive and specific tool for the diagnostic of typical and atypical EAEC employing isolated colonies of *E. coli* from stool cultures.

Keywords: Diarrhea. Enteroaggregative *Escherichia coli*. multiplex PCR. Diagnostic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do plasmídio de virulência pAA2 da amostra protótipo EAEC 042 com a localização dos genes que codificam fatores de virulência....	27
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR para detecção de <i>aaiA</i> , <i>aaiC</i> , <i>aaiG</i> e <i>aaiU</i>	44
Figura 3 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos parciais dos genes <i>aaiA</i> , <i>aaiC</i> , <i>aaiG</i> e <i>aaiU</i>	47
Figura 4 - Frequência dos genes cromossômicos.....	51
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto da PCR para detecção de <i>aggR</i>	53
Figura 6 - Alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos do gene <i>aggR</i>	54
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR multiplex para detecção de <i>aaiG</i> , <i>aaiA</i> , <i>aaiC</i> e <i>aggR</i>	56
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR multiplex para detecção de <i>aaiG</i> , <i>aaiA</i> , <i>aaiC</i> e <i>aggR</i> utilizando DNA purificado da amostra EAEC 042 em diversas concentrações.....	57
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR multiplex com amostras representativas de EAEC típicas e atípicas.....	58
Figura 10 - Avaliação da detecção de EAEC típicas e atípicas pela PCR multiplex.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos epidemiológicos sobre a etiologia da diarreia aguda com pesquisa de EAEC atípica.....	32
Tabela 2 – Sequências dos iniciadores, tamanho dos fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para os genes <i>aaiA</i> , <i>aaiC</i> , <i>aaiG</i> e <i>aaiU</i>	38
Tabela 3 - Sequências dos iniciadores, tamanho dos fragmentos amplificados e ciclo de amplificação da reação de PCR <i>multiplex</i> para os marcadores de virulência de EAEC.....	41
Tabela 4 – Frequência dos genes <i>aaiA</i> , <i>aaiC</i> , <i>aaiG</i> e <i>aaiU</i> em amostras de <i>E. coli</i> diarreiogênicas, <i>E. coli</i> da microbiota intestinal e outras enterobactérias.....	45
Tabela 5 – Perfis genéticos das amostras de EAEC típicas e atípicas com relação aos genes <i>aaiA</i> , <i>aaiC</i> , <i>aaiG</i> e <i>aaiU</i>	51
Tabela 6 – Sequências dos iniciadores, ciclo de amplificação, concentração (pmol) dos iniciadores utilizados na PCR <i>multiplex</i>	55
Tabela 7 – Classificação das 74 amostras de <i>E. coli</i> fecais positivas no ensaio PCR <i>multiplex</i>	59
Tabela 8 – Combinações de genes detectados das 74 amostras de <i>E. coli</i> fecais positivas no PCR <i>multiplex</i> e suas classificações.....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Diarreia e saúde pública.....	15
1.2 <i>Escherichia coli</i>.....	16
1.3 <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica.....	17
1.3.1 <i>Escherichia coli enteropatogênica</i>	18
1.3.2 <i>Escherichia coli enterotoxigênica</i>	19
1.3.3 <i>Escherichia coli produtora da toxina de Shiga</i>	20
1.3.4 <i>Escherichia coli enteroinvasora</i>	21
1.3.5 <i>Escherichia coli que adere difusamente</i>	22
1.3.6 <i>Escherichia coli enteroagregativa</i>	23
2 OBJETIVOS.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Amostras Bacterianas.....	36
3.2 Cultivo das Amostras Bacterianas.....	37
3.3 Pesquisa dos genes <i>aaiA</i>, <i>aaiC</i>, <i>aaiG</i> e <i>aaiU</i>.....	37
3.3.1 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	37
3.3.2 <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	39
3.3.3 <i>Sequenciamento dos amplicons</i>	39
3.4. PCR <i>multiplex</i>.....	40
3.5. Limite de detecção da PCR <i>multiplex</i>.....	41
3.6 Validação da PCR <i>multiplex</i>.....	42
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Frequência dos genes <i>aaiA</i>, <i>aaiC</i>, <i>aaiG</i> e <i>aaiU</i>.....	44
4.2 PCR <i>multiplex</i> utilizando os genes <i>aaiA</i>, <i>aaiG</i>, <i>aggR</i> e <i>aatA</i>.....	52
4.3 Sensibilidade e especificidade da PCR <i>multiplex</i>.....	59
5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÃO.....	70

REFERÊNCIAS..... 71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diarreia e saúde pública

A doença diarreica é um importante problema de saúde pública já que no mundo ocorrem cerca de dois milhões de mortes por ano, causadas por essa doença (BLACK et al., 2010; FISCHER WALKER et al., 2012). A maior parte desses casos acomete crianças menores de cinco anos, residentes em países em desenvolvimento (PETRI et al., 2008), nos quais há falta de saneamento básico, higiene e água potável (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; WHO, 2009).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, cerca de 5 milhões de crianças brasileiras até 14 anos de idade sofrem risco de doenças, pois residem em domicílios sem estrutura de saneamento básico. Até o ano de 2011, 71,8% municípios brasileiros não possuíam uma política municipal de saneamento básico (IBGE, 2011). Sendo assim, também no Brasil a doença diarreica continua sendo um grave problema de saúde pública, importante causa de morbidade e mortalidade infantil, principalmente nas regiões norte e nordeste (OLIVEIRA; LATORRE, 2010).

A diarreia é caracterizada pela alteração no movimento de íons e de água que seguem um gradiente osmótico. Em condições normais o trato grato-intestinal tem uma grande capacidade de absorção de fluidos e eletrólitos. Diariamente cerca de 200 mL de fluidos são excretados nas fezes, provenientes de aproximadamente 9 L de fluídos absorvidos pelo trato intestinal (HODGES; GILL, 2010).

Esta patologia está associada a vírus, bactérias e outros parasitas, sendo que nos países em desenvolvimento as principais causas de infecções diarreicas são as bactérias entéricas e parasitas (HODGES; GILL, 2010). Uma variedade de bactérias têm sido escolhidas como modelos para alguns estudos, incluindo *Vibrio cholerae* como um clássico modelo de diarreia secretora, *Clostridium difficile* e *Shigella* spp., como agentes de diarreia inflamatória, assim como, alguns patótipos de *Escherichia coli* para a avaliação da alteração na absorção de íons pelas células epiteliais do intestino (HODGES; GILL, 2010).

1.2 *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. Esse bacilo faz parte da microbiota intestinal de mamíferos e aves, além de estar presente em diversos ambientes terrestres e aquáticos (BOOP et al., 2003).

Este micro-organismo é a espécie anaeróbia facultativa mais abundante dentre os componentes da microbiota intestinal de humanos, que se estabelece logo nas primeiras horas de nascimento residindo no colón humano por toda a vida, estabelecendo assim uma relação simbiótica (FOUHY et al., 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; WINFIELD; GROISMAN, 2003). Existem poucos estudos relatando a relação simbiótica entre seres humanos e *E. coli* que possam justificar a sua dominância na composição da microbiota intestinal, porém, o fato dessa espécie poder utilizar o glutamato presente no colón de forma mais eficiente do que outras espécies residentes permitiria o seu sucesso nesse sítio (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Durante a evolução, alguns clones de *E. coli* adquiriram fatores de virulência que lhes conferiram adaptação a novos nichos e a capacidade de causar um amplo espectro de doenças (CLEMENTS et al., 2012). Esses clones patogênicos de *E. coli* são também conhecidos por patótipos ou patovares (CLEMENTS et al., 2012; CROXEN; FINLAY, 2010). Os vários patótipos de *E. coli* tendem a ser de grupos clonais que são caracterizados por compartilhar dos mesmos antígenos O (sorogrupos) ou antígenos O e H (sorotipos) (BANDO et al., 2009; CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

Os patótipos de *E. coli* podem causar as seguintes patologias: doença diarreica, infecção do trato urinário, meningite e sepse (CLEMENTS et al., 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Desta forma as cepas patogênicas de *E. coli* podem causar infecções intestinais (*E. coli* diarreiogênicas) ou extraintestinais. Estas últimas também são conhecidas por ExPEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RUSSO; JOHNSON, 2000).

1.3 *Escherichia coli* diarreio gênicas

As *E. coli* diarreio gênicas (DEC), são classificadas em seis categorias, ou patótipos, de acordo com características específicas baseadas em seus mecanismos de patogenicidade, padrões distintos de adesão em células epiteliais cultivadas ou síndromes clínicas que causam. A classificação atual define os seguintes patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) (CLEMENTS et al., 2012; CROXEN; FINLAY, 2010).

Embora esta classificação seja mundialmente aceita, recentes avanços no conhecimento da patogenicidade de DEC mostraram que algumas categorias incluem micro-organismos distintos, tais como EPEC e EAEC que foram subdivididas em típicas e atípicas (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006) e as EHEC que passaram a fazer parte de uma subcategoria de *E. coli* produtora da toxina Shiga, ou STEC (NGUYEN; SPERANDIO, 2012).

Recentemente uma nova classificação foi proposta por Clements et al. (2012) na qual as *E. coli* são divididas em oito patótipos: os seis anteriormente descritos acrescidos de *E. coli* aderente invasiva (AIEC), associada com a doença de Crohn, e *E. coli* enteroagregativa produtora da toxina Shiga (STEAEC), responsável por um grande surto diarreico em 2011 na Europa.

Outro potencial patógeno de DEC proposto é denominado de *E. coli* citodestacante ou *Cell Detaching E. coli* (CDEC), caracterizadas pela atividade hemolítica e capacidade de destacar monocamadas de células epiteliais em cultura (GUNZBURG et al., 1993; OKEKE, 2009). Porém, CDEC ainda não foi significativamente associada a casos de diarreia (KNUTTON et al., 2001; MARQUES et al., 1995; OKEKE et al., 2000).

1.3.1 *Escherichia coli* enteropatogênica

E. coli enteropatogênica (EPEC) foi o primeiro patótipo de DEC descrito e permanece como importante causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento (OCHOA et al., 2008).

As EPEC são caracterizadas pela capacidade de causar uma lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada lesão *attaching-effacing*, (lesão A/E), característica histopatológica intestinal da infecção por EPEC. A lesão A/E é decorrência da aderência bacteriana inicial e íntima às células da mucosa intestinal, a qual induz mudanças no citoesqueleto da célula hospedeira, formando estruturas semelhantes a um pedestal, levando à destruição das microvilosidades (MOON et al., 1983; FRANKEL; PHILLIPS, 2008). A reorganização do citoesqueleto altera a morfologia e fisiologia normal da região apical das células, o que leva a perda das microvilosidades intestinais e suas funções, culminando com a diarreia (CROXEN; FINLAY, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A lesão A/E é desencadeada por proteínas codificadas em uma ilha de patogenicidade denominada LEE (*locus of enterocyte effacement*) que também está presente em EHEC (McDANIEL et al., 1995).

Posteriormente à definição de EPEC, houve a proposta de subdivisão das amostras pertencentes a esse patótipo em dois grupos: EPEC típica e atípica (KAPER, 1996). Essa classificação foi adotada e segue em uso (HERNANDES et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). EPEC típica compreende as bactérias que apresentam o plasmídio EAF (EPEC *adherence fator*) e EPEC atípica as que não apresentam esse plasmídio e diferem das EHEC por não produzirem a toxina Shiga (Stx) (KAPER, 1996). Esse plasmídio alberga os genes envolvidos na montagem e expressão de uma adesina fimbrial, BFP (*bundle-forming pilus*), envolvida na patogênese de EPEC típica, que permite a aderência interbacteriana e possibilita a adesão às células epiteliais (GIRÓN et al., 1993; VIDAL et al., 2007).

Quando em contato com células epiteliais em cultura, amostras de EPEC típicas apresentam um padrão característico de adesão denominado adesão localizada (AL), no qual as bactérias estão aderidas em grupos compactos, em um

ou mais pontos na superfície da célula epitelial (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984).

Este fenótipo é decorrente da expressão da fímbria BFP (GIRÓN et al., 1993), ausente em EPEC atípica (HERNANDES et al., 2009). Por essa razão, amostras de EPEC atípica expressam frequentemente o padrão de adesão localizada-*like* (AL-L), onde as bactérias aderem em grupos bastante esparsos, em um ou mais pontos da superfície da célula hospedeira (RODRIGUES et al., 1996).

Além do padrão AL-L, os padrões difuso (AD) e agregativo (AA) de adesão também são observados em algumas amostras de EPEC atípica (HERNANDES et al., 2006; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). No padrão AD as bactérias aderem difusamente por toda a superfície celular (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984), enquanto no padrão AA as bactérias estão aderidas umas às outras, tanto na superfície celular como na lamínula, formando agregados semelhantes a tijolos empilhados (NATARO et al., 1987). Embora AD e AA sejam a priori os padrões que definem amostras de DEC como DAEC e EAEC, respectivamente (NATARO; KAPER, 1998), amostras que albergam a região LEE, mas expressam esses padrões são classificadas como EPEC (HERNANDES et al., 2006).

EPEC continua sendo uma das principais causas de diarreia infantil em países em desenvolvimento (HERNANDES et al., 2009; OCHOA; CONTRERAS, 2011). Entretanto, inúmeros estudos epidemiológicos recentes têm mostrado que EPEC atípica é mais frequente do que EPEC típica, situação inversa ao conhecido nas décadas de 1970 a 1990 (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). EPEC atípica tem sido relacionada a casos de diarreia aguda e persistente, especialmente em crianças com menos de dois anos de idade, além de surtos de diarreia em países desenvolvidos (AFSET et al., 2004; HERNANDES et al., 2009; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NGUYEN, et al., 2006; SCALETSKY et al., 1999).

1.3.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica

E. coli enterotoxigênica (ETEC) é o agente etiológico mais frequente da diarreia do viajante e de diarreia aguda em crianças e adultos em zonas endêmicas.

Causa diarreia aquosa que pode variar de uma doença leve a uma doença grave e severa (ISIDEAN et al., 2011; QADRI et al., 2005).

As bactérias pertencentes a essa categoria têm como característica a produção de duas enterotoxinas denominadas termo-lábil e termo-estável. As amostras de ETEC podem expressar uma dessas toxinas ou ambas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TURNER et al., 2006).

A toxina termo-lábil ativa a adenilato ciclase provocando um aumento considerável na produção de AMP cíclico (cAMP) e, conseqüentemente, o aumento na síntese de prostaglandinas, pelas células intoxicadas e um excessivo acúmulo de sal e água no lúmen intestinal causando a morte celular, assim como, os sintomas da diarreia aquosa causada por ETEC (SPANGLER, 1992). A toxina termoestável causa a elevação dos níveis de GMP cíclico, com conseqüente desequilíbrio no metabolismo hidrossalino causado pela ativação de guanilato ciclase (TURNER et al., 2006).

Além dessas toxinas, ETEC apresenta diversos fatores de colonização, que são estruturas adesivas da superfície bacteriana (ISIDEAN et al., 2011). Elas permitem que esse patótipo colonize a mucosa do intestino, viabilizando a expressão das toxinas (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996; QADRI et al., 2005).

1.3.3 Escherichia coli produtora da toxina Shiga

E. coli produtora da toxina Shiga (STEC) é um importante enteropatógeno em todo o mundo, podendo causar diarreia aguda, diarreia sanguinolenta e complicações de grande importância clínica, como a colite hemorrágica ou a síndrome hemolítica urêmica (CLEMENTS et al., 2012; HUNT, 2010). Essas bactérias produzem uma potente toxina denominada toxina Shiga (Stx), responsável pela diarreia sanguinolenta e desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica, ou SHU (BERGAN et al., 2012).

O gado bovino e outros ruminantes são reservatórios naturais de STEC, sendo a principal via de contaminação o consumo de água ou alimentos contaminados com as fezes desses animais. Dessa forma, as infecções causadas por STEC são consideradas zoonoses (KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2010).

Há uma subcategoria de STEC, denominada EHEC que também causa a SHU, sendo que a diarreia provocada por esse patótipo pode ser sanguinolenta ou não (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RILEY et al., 1983). O que difere as EHEC das demais STEC é que EHEC possui a ilha de patogenicidade LEE, desse modo, é capaz de causar a lesão A/E, semelhante à induzida por EPEC, além de estar intimamente associada com a SHU (CROXEN; FINLAY, 2010; NGUYEN; SPERANDIO, 2012).

O principal fator de virulência de EHEC é a toxina Stx, é conhecida também como verotoxina (NATARO; KAPER, 1998). Stx é constituída por cinco subunidades B idênticas e uma única subunidade A. As subunidades B são responsáveis pela ligação ao receptor Gb3, que é expresso amplamente nas células endoteliais glomerulares. Após a endocitose mediada pelo receptor, a subunidade A é internalizada e ativada, levando à depuração de adenosinas específicas no RNA ribossômico 28S, que resulta na inibição irreversível do alongamento da proteína e apoptose das células endoteliais (BERGAN et al., 2012). A toxina Stx é produzida no colón e transportada pela corrente sanguínea até os rins, onde irá causar danos nas células endoteliais renais e obstruir a microvasculatura, através da combinação da toxicidade direta e indução local da produção de quimiocinas, resultando assim na inflamação renal que pode levar ao desenvolvimento de SHU (POLITO; KIRZTAJN, 2010; NGUYEN; SPERANDIO, 2012).

1.3.4 *Escherichia coli* enteroinvasora

Escherichia coli enteroinvasora (EIEC) é o único patótipo de *E. coli* com patogênese intracelular, capaz de invadir e se replicar em células epiteliais e macrófagos, induzindo a apoptose nessas células. Além disso, pode elaborar uma ou mais enterotoxinas importantes na patogênese da diarreia causada por este patógeno (CROXEN; FINLAY, 2010).

O mecanismo de patogenicidade de EIEC consiste de cinco etapas: penetração na célula epitelial, lise do vacúolo endocítico, multiplicação bacteriana, movimentação no citoplasma e passagem para as células adjacentes (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PARSOT, 2005). Quando a infecção é severa essa

sequência de eventos leva a uma forte reação inflamatória, causando possíveis ulcerações gerando um quadro de disenteria, com a presença de sangue e muco nas fezes (COSSART; SANSONETTI, 2004), porém algumas vezes EIEC causa somente diarreia aquosa indistinguível de outras *E. coli* patogênicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998).

Os genes necessários para este complexo mecanismo de patogenicidade estão albergado em um plasmídio de virulência presente também em *Shigella* spp. (JOHNSON; NOLAN, 2009). Este plasmídio codifica um sistema de secreção do tipo III que resulta múltiplos efeitos da patogenicidade de EIEC e de *Shigella*, secretando uma variedade de proteínas entre elas: IpaA, IpaB, IpaC, IpgD, que medeiam diversos eventos como sinalização das células epiteliais, o rearranjo do citoesqueleto, a absorção celular, a lise de vacúolos endocíticos, entre outras ações (CLEMENTS et al., 2012). Dessa forma, EIEC e *Shigella* spp. compartilham genes de virulência e mecanismos de patogenicidade (COSSART; SANSONETTI, 2004).

1.3.5 *Escherichia coli* que adere difusamente

E. coli que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) é caracterizada por apresentar o padrão de aderência difusa (AD) em culturas de células HeLa ou HEp-2 (NATARO et al., 1987; SCALETISKY; SILVA; TRABULSI, 1984).

A associação epidemiológica entre DAEC e diarreia aguda é controversa, uma vez que a maioria dos estudos epidemiológicos sobre a etiologia da diarreia aguda não associa DAEC à diarreia (GOMES et al., 1998; NATARO et al., 1987; RODRIGUES et al., 2002). Por outro lado, parece existir correlação quando as populações são estratificadas por faixas etárias (GIRÓN et al., 1991; SCALETISKY et al., 2002; SPANO et al., 2008).

A patogênese da diarreia causada por esse patótipo permanece desconhecida, porém alguns potenciais fatores de virulência já foram identificados em DAEC (BENZ; SCHMIDT, 1992; BILGE et al., 1989; GUIGNOT et al., 2007; LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006; TADDEI et al., 2003).

Tem sido relatada a presença de adesinas fimbriais (F1845) e não fimbriais (AIDA-1, Sfa e P) em DAEC (LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006), entretanto o real papel das mesmas na patogênese da diarreia ainda não está definido.

A proteína autotransportadora *secreted autotransporter toxin* (Sat) foi identificada em DAEC isoladas de casos de diarreia. Foi demonstrado ainda que Sat é mais comumente detectada em DAEC isoladas de crianças com diarreia do que de crianças saudáveis (GUIGNOT et al., 2007; TADDEI et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que amostras de DAEC são capazes de induzir a extensão de projeções longas e finas da superfície celular, que envolve a bactéria e a protege da ação de antimicrobianos (COOKSON; NATARO, 1996; YAMAMOTO et al., 1992).

1.3.6 *Escherichia coli* enteroagregativa

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é definida como o patótipo de DEC que expressa o padrão de adesão agregativa (AA) em células epiteliais cultivadas (NATARO; KAPER, 1998). No padrão AA as bactérias formam agregados em uma configuração que lembra tijolos empilhados. Essa adesão ocorre na superfície das células e também na superfície da lamínula formando arranjos que remetem aos favos de uma colmeia (NATARO et al., 1987).

Esse padrão foi descrito durante a análise da aderência em células HEp-2 de amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda no Chile (NATARO et al., 1987). Nesse estudo, os autores foram capazes de subdividir o fenótipo anteriormente descrito como aderente difuso (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984) em duas classificações: aderência agregativa (AA) e a aderência difusa (DA) propriamente dita. A alta prevalência do padrão AA em *E. coli* de crianças com diarreia, levou à proposição do novo patótipo de DEC, denominado EAEC (NATARO; KAPER, 1998).

Dentre os agentes etiológicos bacterianos da diarreia EAEC se destaca como um enteropatógeno emergente ao redor do mundo (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Nos últimos anos tem sido relatada a associação entre EAEC e diarreia aguda na infância, tanto em países em desenvolvimento (ARAUJO et al.,

2007; BUERIS et al., 2007; NGUYEN et al., 2005; OKEKE et al., 2003; SCALETISKY et al., 2002), como desenvolvidos (COHEN et al., 2005; NATARO et al., 2005; ROBINS-BROWNE et al., 2004).

No Brasil, vários estudos epidemiológicos recentes sobre a etiologia da diarreia aguda têm apontado EAEC como o patótipo de DEC mais prevalente (ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; GARCIA; SILVA; DINIZ, 2011; MORENO et al., 2010; PEREIRA et al., 2007; REGUA-MANGIA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2002; SCALETISKY et al., 2002).

Vários surtos de diarreia em países desenvolvidos foram causados por cepas de EAEC e associados à ingestão de alimentos ou água contaminados (HARADA et al., 2007; ITOH et al., 1997; SMITH; CHEASTY; ROWE, 1997). Em 2011 um grande surto de diarreia que acometeu vários países da Europa foi causado por uma amostra de *E. coli* (sorotipo O104:H4) produtora de toxina Stx2 (BIELASZEWSKA et al., 2011). O sequenciamento do genoma dessa amostra revelou que se tratava de uma EAEC que adquiriu genes do fago que codifica Stx2 (RASKO et al., 2011). Esse surto foi associado ao consumo de alimento contaminado e teve graves consequências médicas, devido ao grande número de pacientes hospitalizados e que desenvolveram a SHU (MUNIESA et al., 2012).

A ingestão de alimentos contaminados talvez seja uma forma de infecção por EAEC, pois já houve relatos em países desenvolvidos da ocorrência de diversos surtos provocados por essa via (ITOH et al., 1997; HARADA et al., 2007; SMITH; CHEASTY; ROWE, 1997). No Brasil EAEC foi detectada em leite de mamadeiras de lactantes de baixo nível sócio econômico que haviam sido atendidos em ambulatórios de hospitais públicos, o que favorece a possibilidade de infecção por EAEC a partir de alimentos contaminados (MORAIS; GOMES; SIGULEM, 1997).

EAEC está fortemente associada à diarreia persistente, ou seja, com duração maior que 14 dias (BHAN et al., 1993; CRAVIOTO et al., 1991; FANG et al., 1995; LIMA et al., 1992), o que pode levar a má nutrição, problemas de crescimento e de desenvolvimento cognitivo (NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

Vários estudos sobre a etiologia da diarreia do viajante, que é aquela que afeta indivíduos residentes de países desenvolvidos que visitam países em

desenvolvimento, apontam a alta prevalência de EAEC como agente desses casos (ADACHI et al., 2002; JIANG et al., 2002; MOHAMED et al., 2007).

EAEC esta também associada com diarreia crônica em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, ou SIDA (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; MATHEWSON et al., 1995; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; SAMIE et al., 2007).

De fato, Huang et al. (2006) demonstraram através de um estudo de meta-análise da literatura entre 1987 e 2006 que EAEC esteve estatisticamente associada à diarreia aguda e persistente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, à diarreia em pacientes com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) e à diarreia do viajante.

Os sintomas mais comuns relatados na infecção por EAEC são diarreia aquosa com ou sem sangue e muco, dor abdominal, náusea, vômito e pouca febre. A diversidade de sintomas clínicos na infecção por esse patótipo pode ser devido à heterogeneidade entre os isolados de EAEC, à dose infecciosa e a fatores de susceptibilidade genética do hospedeiro, assim como, à reposta imune (HARRINGTON, DUDLEY; NATARO, 2006; HUANG et al., 2006).

Essa heterogeneidade ficou bastante evidente em um estudo com voluntários humanos que receberam inóculos por via oral de quatro amostras de EAEC, sendo que apenas uma delas causou diarreia (NATARO et al., 1995). Essa amostra denominada EAEC 042 (sorotipo O44:H18) passou então a ser amplamente caracterizada e considerada como protótipo (NAVARRO-GARCIA; ELIAS 2011).

Várias adesinas, toxinas e proteínas envolvidas em algum processo de virulência têm sido identificadas em EAEC, mas a prevalência dos genes que codificam esses marcadores é bastante variável e nenhum deles foi encontrado em todas as amostras (BOUZARI; JAFARI; ZAREPOUR, 2005; CZECHULIN et al., 1999; ELIAS et al., 2002; GIOPPO et al., 2000; JENKINS et al., 2006a; MOHAMED et al., 2007; OKEKE et al., 2003; PIVA et al., 2003; ZAMBONI et al., 2004). Essa complexidade não permitiu que a patogênese da diarreia causada por esse patótipo fosse totalmente esclarecida (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

Apesar da complexidade e heterogeneidade de EAEC, um modelo com três estágios foi proposto para a patogênese da diarreia: (a) o primeiro estágio envolve a

aderência na mucosa intestinal e na camada de muco através de adesinas fimbriais e/ou afimbriais; (b) no segundo estágio há a formação de abundante biofilme e aumento da produção de muco pelos enterócitos, o que pode promover uma colonização persistente e má absorção de nutrientes; (c) por último há a secreção de toxinas e outras proteínas de virulência levando à indução de resposta inflamatória, havendo alteração na mucosa e na secreção intestinal (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; HUANG; DUPONT, 2004; NAVARRO-GARCIA, et al., 2010).

Diversos fatores de virulência de EAEC são codificados por genes localizados no plasmídio ou no cromossomo das amostras consideradas protótipo. Dentre esses fatores estão diversas adesinas, toxinas, proteínas secretadas e sideróforos, identificados principalmente na EAEC 042, cujo genoma completo já foi sequenciado (CHAUDHURI et al., 2010; NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

Devido à associação do fenótipo de aderência agregativa com plasmídios e ao grande número de potenciais fatores de virulência plasmidiais, esses plasmídios são conhecidos por plasmídios de virulência de EAEC e denominados pAA (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006)

O plasmídio pAA1 presente na amostra protótipo EAEC 17-2 (sorotipo O3:H2) apresenta cerca de 100 kb. Essa amostra foi a primeira EAEC a ser estudada geneticamente com relação às propriedades de aderência, o que permitiu a identificação da primeira fímbria de adesão agregativa (AAF/I) codificada no pAA1. Nesse plasmídio estão localizados os genes da biogênese de AAF/I, o regulador transcricional AggR, toxina EAST-1, proteína dispersina e seu sistema de secreção do tipo ABC (NATARO et al., 1992; NATARO et al., 1994; SAVARINO et al., 1991).

O plasmídio pAA2 presente na amostra EAEC 042 também apresenta aproximadamente 100 Kb e codifica muitos fatores de virulência bem caracterizados, tais como as toxinas Pet e EAST-1, a fímbria de aderência agregativa AAF/II, o regulador transcricional AggR, a proteína dispersina, seu sistema de secreção do tipo ABC e as proteínas Shf, VirK e CapU (CHAUDHURI et al., 2010; CZECHULIN et al., 1999). A figura 1 apresenta um esquema do pAA2 e a localização desses genes de virulência.

Figura 1 - Esquema do plasmídeo de virulência pAA2 da amostra protótipo EAEC 042 com a localização dos genes que codificam fatores de virulência. *aafABCD*, genes da biogênese da fímbria AAF/II; *aggR*, codifica a proteína AggR, ativadora transcricional de genes de virulência plasmidiais e cromossômicos; *astA*, codifica a toxina EAST-1; *pet*, codifica a toxina Pet; *aap*, codifica a proteína dispersina; CVD432, fragmento sonda para diagnóstico de EAEC correspondente a parte do gene *aatA*; operon *shf-capU-virK*, codificam as proteínas Shf, CapU e VirK, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Chaudhuri et al., 2010 e Czeckulin et al., 1999.

Estudos sobre a patogênese de EAEC são focados no regulador transcricional AggR e a expressão de vários fatores de virulência presentes no pAA2 dependem deste regulador, definindo o regulon AggR (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Morin et al. (2012) confirmaram a existência de ao menos 44 genes regulados por AggR utilizando a técnica de *microarray* e qRT-PCR. Destes genes, 16 codificam proteínas hipotéticas e somente cinco mostram homologia com outras proteínas conhecidas, incluindo os genes da biogênese de AAF/II, Pet, dispersina e uma ilha de patogenicidade cromossômica.

Recentemente foi proposta a classificação de amostras de EAEC nos grupos típica e atípica, levando em conta a presença ou ausência do gene *aggR* e, consequentemente, de seu regulon (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO 2006;

SARANTUYA et al., 2004). Essa classificação definiria dois grupos de amostras, sendo que o primeiro constituído pelas amostras típicas, com maior potencial patogênico pelo fato de apresentarem os genes de virulência regulados por *AggR* e o plasmídeo de virulência pAA (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SARANTUYA et al., 2004).

No estágio inicial de aderência de EAEC participam adesinas fimbrias e afimbriais. Entretanto, apenas as adesinas fimbriais têm sido caracterizadas geneticamente (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Quatro fimbrias de aderência agregativa (AAF) já foram caracterizadas em EAEC (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; BOISEN et al., 2008; CZECHULIN et al., 1997; NATARO et al., 1992).

A fímbria AAF/I é responsável pelo padrão AA da amostra EAEC 17-2 (NATARO et al., 1992). Os genes responsáveis pela biogênese dessa fímbria estão localizados em duas regiões do plasmídeo pAA1, designadas como região 1 (operon *aggABCD*) e região 2 (regulador transcricional *aggR*) (NATARO et al., 1992; NATARO et al., 1994; SAVARINO et al., 1994).

A fímbria AAF/II é responsável pelo fenótipo AA expresso pela amostra EAEC 042 (CZECHULIN et al., 1997). Os genes responsáveis pela biogênese de AAF/II estão localizados no plasmídeo pAA2 em duas regiões organizadas de forma peculiar, uma contendo os genes *aafA*, *aafD* e *aggR* (região 1) e a outra o gene *aafC* (região 2) (ELIAS et al., 1999).

A terceira fímbria, denominada AAF/III foi identificada na amostra de EAEC 55989 (sorotipo O104:H4) e também está envolvida na adesão às células epiteliais no padrão AA (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002). Os genes responsáveis pela biogênese dessa fímbria são denominados *agg3ABCD* e *aggR* e estão organizados em duas regiões no plasmídeo pAA3 similares à organização genética de AAF/I (NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

A adesina descrita por Boisen et al. (2008), responsável pelo padrão de adesão AA na amostra C1010-00 (sorotipo OR:H1) isolada na Dinamarca, foi inicialmente denominada HdA. O operon *hdaABCD* que codifica a fímbria é aparentemente regulado por *aggR* e responsável pelo fenótipo agregativo em amostras de EAEC que não apresentam as outras adesinas AAF. Posteriormente,

essa adesina foi renomeada AAF/IV e seu *operon* chamado de *agg4ABCD* (BOISEN et al., 2012; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Foi demonstrado que em uma amostra de EAEC atípica isolada na Sérvia denominada C1096 (sorotipo O4:HNT), a adesão agregativa em células epiteliais cultivadas e à superfície abiótica era mediada por um pili do tipo IV, codificado por genes presentes em um plasmídio do grupo de incompatibilidade IncI1. O gene *pilS* codifica a pilina correspondente a subunidade principal do pili tipo IV descrito nessa amostra. A expressão do pili tipo IV é necessária, mas não totalmente responsável pela aderência agregativa e formação de biofilme (COBELJIC et al., 1996; DUDLEY et al., 2006a).

A proteína dispersina ou Aap (*anti aggregation protein*) constitui um importante fator de virulência de EAEC, responsável por mediar a dispersão de EAEC na mucosa intestinal (SHEIKH et al., 2002). É codificada pelo gene *aap* localizado no plasmídio pAA2 (CZECZULIN et al., 1999; SHEIKH et al., 2002). A dispersina é uma proteína secretada para o meio externo onde fica ligada ao lipopolissacarídeo da bactéria, o que neutraliza a carga negativa da superfície da célula bacteriana e permite a projeção das fímbrias AAF, levando a um fenótipo de antiagregação e dispersão da bactéria pela mucosa intestinal (VELARDE et al., 2007).

A dispersina requer um sistema de transporte do tipo ABC, codificado pelo operon *aatPABCD* (*enteroaggregative ABC transporter*), presente no plasmídio pAA2 (NISHI et al., 2003). O gene *aatA* corresponde ao fragmento sonda CVD432, desenvolvido por Baudry et al. (1990), e codifica uma proteína de membrana externa que age diretamente como um poro para a translocação da proteína dispersina (NISHI et al., 2003).

O gene *shf*, também localizado no pAA2, não apresenta função conhecida, mas tem homologia com dois genes descritos em *Shigella flexneri* 2a (*shf1* e *shf2*) que codificam uma proteína similar a IcaB de *Staphylococcus epidermidis* relacionada com a formação de biofilme (CZECZULIN et al., 1999). Estudos com a amostra protótipo EAEC 042 e mutantes sugerem que o gene *shf* não tem relação com a agregação na fase líquida e na fase inicial de aderência, mas é necessário para formar múltiplas camadas no biofilme na fase de maturação, exercendo papel crucial

na capacidade de formação de biofilme (FUJIYAMA et al., 2008; VASCONCELLOS, 2009).

EAEC produz alguns efeitos citotóxicos como vesiculação das microvilosidades e aumento na extrusão das células epiteliais (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Várias toxinas têm sido associadas a estes efeitos citotóxicos. Dentre elas Pet e EAST-1, codificadas por genes plasmidiais (ESLAVA et al., 1998; SAVARINO et al., 1993), e Shet1 e Pic, codificadas por genes cromossômicos (HENDERSON et al., 1999).

EAST-1 (*enteroaggregative heat-stable toxin 1*) é uma enterotoxina termo-estável, mas imunológica e geneticamente distinta da toxina termo-estável de ETEC (SAVARINO et al., 1991). É codificada pelo gene *astA* presente nos plasmídios pAA (CZECZULIN et al., 1999). A toxina ativa adenilato ciclase, induzindo a ação de GMP cíclico que altera o transporte de íons gerando uma resposta secretória (SAVARINO et al., 1991; SAVARINO et al., 1993).

A toxina Pet (*plasmid-encoded toxin*), pertence à classe de proteínas autotransportadoras (CZECZULIN et al., 1999; NAVARRO-GARCIA et al., 1998). Pet é uma citotoxina que altera o citoesqueleto dos enterócitos levando ao arredondamento e descolamento celular. O mecanismo citotóxico de Pet decorre da degradação da α -fodrina, uma proteína de membrana dos enterócitos (NAVARRO-GARCIA et al., 1998; VILLASECA et al., 2000).

Pic (*protein involved in colonization*), também uma proteína autotransportadora, apresenta atividade mucinolítica e de hemaglutinação. Os fenótipos identificados para Pic sugerem que ela esteja envolvida nas fases iniciais da patogênese de EAEC, promovendo a colonização do intestino (HENDERSON, et al., 1999; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Recentemente foi identificada uma ilha de patogenicidade (PAI) inserida no *locus* do tRNA *pheU* no cromossomo da amostra EAEC 042. Essa PAI *pheU* apresenta 117 kb e codifica um sistema de secreção do tipo VI codificado pelo operon *aai* (*AggR-activated island*) composto por 25 genes (de *aaiA* até *aaiY*). (DUDLEY et al., 2006b). No sistema de secreção do tipo VI descrito na amostra protótipo 042 o aparato para a secreção da proteína AaiC é composto pelos genes

aaiA até *aaiP*. *AaiC* foi descrita como sendo uma proteína que não apresenta homólogos no *GenBank* (DUDLEY et al., 2006b).

A contribuição dos produtos dos genes *aai* na patogênese de EAEC ainda é desconhecida, porém essas proteínas parecem não ter um papel na aderência da bactéria a superfícies abióticas ou das células epiteliais intestinais, como ocorre com outros genes regulados por AggR (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

A distribuição desses e de outros genes de virulência não é homogênea entre as cepas de EAEC, evidenciando a heterogeneidade deste patótipo. Dessa forma é difícil fornecer uma definição genotípica para EAEC ou propor com exatidão todo o modelo de patogênese. Essa heterogeneidade esclarece em parte a falha de alguns estudos em associar essas cepas à diarreia e sugerem que somente um determinado grupo de isolados de EAEC sejam patógenos humanos (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

O padrão AA, demonstrado no teste de adesão em células HeLa ou HEp-2, é considerado como o diagnóstico padrão para a identificação de EAEC, uma vez que ainda não foi encontrado um determinante genético comum para todas as amostras deste patótipo (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; NATARO, 2005). Entretanto, a técnica do teste de adesão em células epiteliais cultivadas é dispendiosa, demorada e necessita de infraestrutura restrita a laboratórios de referência. Na tentativa de propor um ensaio com menos limitações, aderência em células HEp-2 fixadas com formalina foi proposta para facilitar a execução do ensaio, porém apesar da boa especificidade e sensibilidade, não tem sido utilizada (MIQDADY et al., 2002).

Como alternativa aos ensaios de adesão, técnicas moleculares de diagnóstico de EAEC começaram a ser desenvolvidas, por serem mais rápidas, práticas e possibilitarem a análise de um maior número de amostras.

Baudry et al. (1990) desenvolveram uma sonda para o diagnóstico de EAEC, denominada CVD432, a qual foi inicialmente descrita como um fragmento críptico do plasmídeo pAA1 da amostra EAEC 17-2. Essa sonda tem sido amplamente utilizada em diversos estudos epidemiológicos, demonstrando especificidade e sensibilidade muito variável (FANG et al., 1995; GIOPPO et al., 2000; GOMES et al., 1998; OKEKE et al., 2003).

Posteriormente, esse fragmento foi sequenciado permitindo a síntese de um par de iniciadores para a detecção de EAEC através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) (SCHMIDT et al., 1995). Recentemente, Nishi et al. (2003) evidenciaram que o fragmento sonda CVD432 corresponde à parte do gene *aatA* que, conforme mencionado anteriormente, faz parte de um operon de cinco genes (*aatPABCD*) que codificam as proteínas do sistema do tipo ABC de secreção. Desta forma, a sonda CVD432 passou a ser corretamente denominada de *aatA*.

A reatividade com o fragmento *aatA*, através de ensaios de hibridização de colônias ou PCR, indica a presença do plasmídeo pAA, ou seja, detecta apenas amostras de EAEC típicas. Essa técnica exclui a grande maioria das EAEC atípicas, as quais são bastante prevalentes em vários países, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Estudos epidemiológicos sobre a etiologia da diarreia aguda com pesquisa de EAEC atípica

Local de isolamento	População estudada	Método de detecção	Reatividade com <i>aggR</i>		Referência
			% de amostras positivas	% de amostras negativas	
Bamako, Mali	Crianças até 5 anos	PCR (<i>aaiC</i> e <i>aatA</i>)	69,4	30,6	Boisen et al., 2012
México, Índia e Guatemala	Adultos	AA em células HEp-2	30	70	Huang et al., 2007
Hamadan, Irã	Crianças até 12 anos	Sonda CVD432 e AA em células HeLa	73,3	26,7	Aslani et al., 2010
São Paulo, Brasil	Crianças até 5 anos	Sonda CVD432 e AA em células HeLa	74,2	25,8	Elias et al., 2002
México	Adultos	AA em células HEp-2	27,5	72,5	Huang et al., 2003
Brasil (várias localidades)	Crianças até 2 anos	AA em células HEp-2	71,5	28,4	Zamboni et al., 2004
Índia, Jamaica e México	Adultos	AA em células HEp-2	41	59	Jiang et al., 2002
Espírito Santo, Brasil	Crianças até 12 anos	Sonda CVD432 e AA em células HEp-2	16,4	83,6	Monfardini, 2012

Há vários relatos na literatura sobre o desenvolvimento de PCR *multiplex* para a detecção de vários patótipos de DEC simultaneamente. Entretanto, aqueles ensaios que incluem a detecção de EAEC utilizam na sua maioria apenas um ou dois marcadores plasmidiais, não abordando a detecção de EAEC atípica (ARANDA et al., 2007; BUERIS et al., 2007; FUJIOKA et al., 2009; PANCHALINGAM et al., 2012; SOUZA et al., 2013; TOMA et al., 2003).

Alguns autores propuseram o diagnóstico isolado para EAEC baseado na técnica de PCR *multiplex*, empregando a detecção simultânea de marcadores plasmidiais (BOUZARI; JAFARI; ZAREPOUR, 2005; CERNA; NATARO; GARCIA-ESTRADA, 2003; RÜTTLER et al., 2006) ou plasmidiais e cromossômicos (JENKINS et al., 2006b).

Cerna, Nataro e Garcia-Estrada (2003) padronizaram uma PCR *multiplex* para a detecção de três genes plasmidiais de EAEC (*aatA*, *aap* e *aggR*). O método foi eficaz para a detecção de EAEC, porém só foram avaliadas amostras pertencentes a este patótipo, não permitindo os cálculos de especificidade e sensibilidade. O mesmo foi realizado por Bouzari, Jafari e Zarepour (2005), alcançando resultados similares. Essa mesma técnica também foi avaliada como específica e sensível para a caracterização de amostras de EAEC isoladas de fezes diarreicas (CORDEIRO et al., 2008). Por outro lado, Monteiro et al. (2009) avaliou essa técnica incluindo amostras de outros patótipos de DEC e *E. coli* não patogênicas, demonstrando que o gene que codifica a dispersina (*aap*) não é exclusivo de EAEC.

Rüttler et al. (2006) padronizaram uma PCR *multiplex* para detecção simultânea de *aggR* e *astA*, que codifica a enterotoxina EAST-1 (SAVARINO et al., 1993). Entretanto, o gene *astA* já foi detectado em outros patótipos de DEC e em *E. coli* da microbiota intestinal (SAVARINO et al., 1996) e dessa forma não é específico para EAEC, fato que impossibilita o seu uso como um marcador para este patótipo.

Já a PCR *multiplex* descrita por Jenkins et al. (2006b) detecta o gene cromossômico *aaiA*, localizado na PAI *aai* inserida em *pheU*, além dos genes plasmidiais *aatA* e *astA*. Esses autores demonstraram que os genes *aatA* e *aaiA* podem ser bons marcadores no diagnóstico de EAEC típicas e atípicas, mas o ensaio descrito detecta também o gene *astA*, mencionado anteriormente como inespecífico para EAEC.

Tendo em vista o significado epidemiológico de EAEC atípica e típica em nosso meio, faz-se necessário o estabelecimento de marcadores de virulência específicos para esses dois subgrupos de EAEC, assim como o desenvolvimento de uma técnica diagnóstica rápida em substituição ao teste de adesão em células HeLa/HEp-2, podendo ser uma alternativa futura também para os laboratórios clínicos na identificação de EAEC.

Desse modo, o presente estudo visa caracterizar e padronizar uma PCR *multiplex* contendo dois genes plasmídicos (*aatA* e *aggR*) e dois cromossômicos, afim de detectar EAEC típica e atípica. Para isso foram selecionados quatro genes cromossômicos (*aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*) pertencentes a PAI *pheU* da EAEC 042 para a determinação de suas frequências e especificidades, permitindo a escolha de dois deles para a composição da PCR *multiplex* para EAEC típica e atípica.

2 OBJETIVOS

Padronizar um ensaio de PCR *multiplex* para o diagnóstico de EAEC típica e atípica e avaliar a sua sensibilidade e especificidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

Como controles positivos foram empregadas neste estudo as amostras protótipo de EAEC típicas 042 e 17-2 (NATARO et al., 1985; NATARO et al., 1992) e como controle negativo foi utilizada a amostra de *E. coli* DH5α (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Nos ensaios de PCR foram empregadas as seguintes coleções de amostras:

- 103 amostras de EAEC isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da doença diarreica na infância na cidade de São Paulo (GOMES et al., 1998). Essas amostras foram classificadas como EAEC através da detecção do padrão AA em células HeLa e caracterizadas quanto à prevalência dos genes de virulência de EAEC (ELIAS et al., 2002; GOMES et al., 1998). Elas fazem parte da coleção de culturas da Profa. Dra. Tânia A. T. Gomes (Disciplina de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP) e foram denominadas EAEC-EPM.
- 97 amostras de *E. coli* diarreiogênicas compreendendo: 40 EPEC (20 típicas e 20 atípicas), 20 ETEC, 17 EIEC, 20 STEC e 20 DAEC, que fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto do Butantan. Essas amostras foram isoladas e caracterizadas em estudos prévios como pertencentes a esses patótipos, devido à presença de fatores de virulência específicos (BUERIS et al., 2007; MAIRENA et al., 2004; MARTINEZ et al., 1999; MENEZES et al., 2006; MONTEIRO et al., 2009; TADDEI et al., 2003). Essa coleção foi denominada DEC-IBu.
- 34 amostras de diferentes espécies da família Enterobacteriaceae, com exceção de *E. coli* (*Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Salmonella Agona*, *S. Infantis*, *Salmonella Newport*, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Providencia* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae*, *Edwardsiella tarda*, *Erwinia* spp. e *Serratia marcescens*), que fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto do Butantan. Essa coleção foi denominada Enterobac-IBu.

- 42 amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da doença diarreica na infância (BUERIS et al., 2007; GOMES et al., 1998). Essas amostras fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto do Butantan e da coleção de culturas da Profa. Dra. Tânia A. T. Gomes (Disciplina de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina - UNIFSEP). Todas essas amostras são desprovidas de marcadores de virulência de DEC e não apresentam padrão de adesão agregativo ou difuso em células epiteliais cultivadas HEp-2 ou HeLa, desse modo são consideradas como *E. coli* não patogênicas. Essa coleção foi denominada Microbiota.

3.2 Cultivo das amostras bacterianas

Todas as amostras bacterianas foram cultivadas em caldo TSB (*tryptic soy broth*) a 37° C durante 18 h. Após esse período, as culturas positivas foram semeadas em ágar McConkey para análise da pureza da cultura. As placas foram mantidas a 37° C durante 18 h e em seguida uma colônia isolada foi transferida para uma nova placa contendo ágar Luria Bertani (LB) também mantidas a 37° C por 18 h. Em seguida, uma colônia isolada foi selecionada para o preparo do lisado, descrito a seguir.

3.3 Pesquisa dos genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*

3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A detecção dos genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU* através da técnica de PCR foi realizada nas coleções EAEC-EPM, DEC-IBu, Enterobac-IBu e Microbiota, utilizando como controles positivos as amostras protótipos de EAEC 042 e 17-2 e como controle negativo a amostra DH5 α . As reações de PCR foram realizadas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, EUA).

Os lisados bacterianos utilizados como DNA molde nas reações de amplificação foram obtidos da seguinte forma: uma colônia isolada de uma placa de

ágar LB foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 300 µL de água MilliQ estéril, submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo.

Para cada reação foram utilizados 1 µL do DNA molde, 2,5 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de cloreto de magnésio, tampão de PCR 1X e 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen). A concentração dos iniciadores foram as seguintes: 40 pmol para *aaiA* e 25 pmol para *aaiC*, *aaiG*, e *aaiU*, sendo essas concentrações satisfatórias para a amplificação dos respectivos genes. As sequências dos iniciadores e os ciclos de amplificação para cada um deles estão listados na tabela 2. As sequências dos iniciadores para os genes *aaiA* e *aaiC* foram obtidos do estudo de Dudley et al. (2006b) e as sequências de *aaiG* e *aaiU* foram desenhadas a partir das respectivas sequências da amostra 042 (número de acesso no GeneBank FN554766).

Tabela 2- Sequências dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e ciclos de amplificação das reações de PCR para os genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*

Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Amplicon	Ciclo de amplificação	Referência
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTCAGGATTGCCATTAG	476 pb	25x: 94 °C/30 s, 50 °C/30 s, 72 °C/30 s.	Dudley et al. (2006b)
<i>aaiC</i>	(F) AAAAAATCTAGATGTCAAAT AGAGATATAGGTG (R) TATATATCTAGAAACAACCT TAAATGATGAGT	278 pb	30x: 94 °C/1 m, 52 °C/1m, 72 °C/1m.	Dudley et al. (2006b)
<i>aaiG</i>	(F) GGGAGTGTTCAGTCTGGA C (R) ATTTGTCACAAGCTCAGCAT	782 pb	30x: 94 °C/1 m, 55 °C/1 m, 72 °C/1 m.	Este estudo
<i>aaiU</i>	(F) CAGACAGGAAGCATGGTTC A (R) CAGGCATGTCATACTCAAG A	806 pb	30x: 94 °C/1m, 54 °C/1 m, 72 °C/1 m.	Este estudo

(F) iniciador *forward*; (R) iniciador *reverse*.

3.3.2 Eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados por aquecimento, fundindo-se agarose (Invitrogen) em tampão TAE 1x (Tris base 0,04 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 mM), nas concentrações de 1 ou 2%. Os fragmentos de DNA obtidos através das reações de PCR foram acrescidos de tampão de amostra 1x (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%). A eletroforese foi realizada utilizando como tampão de corrida também o TAE 1x em uma corrente constante de 70 a 80 V. Os marcadores de tamanho molecular *1 Kb DNA Ladder* (Invitrogen) ou *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen) foram utilizados para verificar o tamanho dos produtos amplificados. As bandas foram detectadas através da coloração por solução de brometo de etídeo na concentração de 10 µg/mL ou com solução de *Gel Red^{TM}* (Molecular Probes, EUA) na concentração de 1:10000 e visualizadas utilizando um transiluminador de luz ultravioleta, registrando as imagens por um sistema de captação de imagens Alphamager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

3.3.3 Sequenciamento dos amplicons

Os produtos amplificados em algumas PCR para a detecção dos genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*, foram sequenciados para confirmação da especificidade dos iniciadores. Os amplicons foram purificados a partir do produto da reação de PCR com auxílio do *GFX^{TM} PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram quantificados a partir de eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando como padrão de concentração de DNA o marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo), utilizando o sequenciador automático *MegaBACE 1000* (Amersham Pharmacia Biotech). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o *kit APBiotech DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (empregando a Thermo Sequenase^{TM} II DNA Polimerase) e os iniciadores específicos, na concentração de 5 pmol cada. As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas com auxílio do

software *BioEdit*. As sequências obtidas foram comparadas com as respectivas da amostra 042 no banco de dados do Pubmed através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), a fim de confirmar a especificidade de todos os iniciadores.

3.4 PCR *multiplex*

Para a padronização da PCR *multiplex* foram utilizados os genes cromossômicos *aaiA* e *aaiG*, escolhidos após a determinação da prevalência dos mesmos nas amostras EAEC-EPM, DEC-IBU, ENTEROBAC-IBU e MICROBIOTA, e os plasmidiais *aatA* e *aggR*. Como controles positivos foram utilizadas as amostras 042 e 17-2 e como controles negativos a amostra DH5 α . Em um primeiro momento a PCR *multiplex* foi testada somente com as amostras EAEC-EPM.

As reações de PCR *multiplex* foram realizadas no termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) seguindo o protocolo descrito no item 3.3.1, utilizando os iniciadores específicos que estão descritos na tabela 3, assim como as condições da reação de PCR *multiplex*.

As concentrações dos iniciadores utilizadas na reação foram as seguintes: 20 pmol para *aaiA*, *aaiG* e *aggR* e 50 pmol para *aatA*. Essas concentrações foram padronizadas através de uma titulação de concentrações de iniciadores de 10 a 100 pmol, variando de 10 pmol em 10 pmol, para cada um deles separadamente. Após a análise dos amplicons em gel de agarose a 1% foi verificada em qual concentração foi obtido um amplicon de melhor qualidade para cada gene e esta concentração foi a escolhida para a montagem da reação de PCR *multiplex*. Após a amplificação os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1%, conforme descrito no item 3.3.2.

Os iniciadores para os genes *aaiA* e *aaiG* foram os mesmos empregados no item 3.3. Para *aatA* foram utilizados iniciadores previamente descritos na literatura (SCHIMIDT et al., 1995).

O iniciador para o gene *aggR* foi desenhado a partir da respectiva sequência da amostra EAEC 042, obtida no GeneBank (número de acesso: FN554767). O

produto amplificado a partir da amostra 042 utilizando esses iniciadores foi sequenciado de acordo com o descrito no item 3.3.3.

Tabela 3 - Sequências dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e ciclo de amplificação da reação de PCR *multiplex* para os marcadores de virulência de EAEC

Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Amplicon	Ciclo de amplificação	Referência
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTCAGGATTGCCATTA G	476 pb	30x: 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 72 °C/7 min	Dudley et al. (2006b)
<i>aaiG</i>	(F) GGGAGTGTTCAGTCTGG AC (R) ATTTGTCACAAGCTCAGCA T	782 pb		Este estudo
<i>aggR</i>	(F) CGATACATTAAGACGCCTA AAG (R) TCTGATACATTAAATTCATC TGC	346 pb		Este estudo
<i>aatA</i>	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCA T (R) CAATGTATAGAAATCCGCT GTT	630 pb		Schmidt et al. (1995)

(F) iniciador *forward*; (R) iniciador *reverse*.

3.5 Limite de detecção da PCR *multiplex*

Para avaliar o limite de detecção da PCR *multiplex* foi utilizado o DNA genômico purificado da amostra protótipo 042 em diferentes concentrações. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit *illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. O produto da extração de DNA foi analisado e quantificado através de eletroforese em gel de agarose a 2% usando como marcador de peso molecular o *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Para confirmação dessa concentração foi realizada a análise no espectrofotômetro

Ultrospec 2100pro (Amersham Biosciences, Reino Unido) através da leitura de absorbância em comprimento de onda de 260 nm.

Para determinar o limite de detecção da PCR *multiplex* (descrita no item 3.4) foi empregado como molde o DNA genômico purificado da amostra 042 e seguido o protocolo de padronização da reação. As seguintes concentrações de DNA foram utilizadas: 1,00 µg, 0,75 µg, 0,50 µg, 0,25 µg, 0,125 µg, 0,100 µg, 0,075 µg, 0,050 µg, 0,025 µg, 0,0125 µg e 0,0100 µg, diluindo com a quantidade necessária de H₂O MilliQ estéril para cada uma das concentrações. Após a amplificação, os produtos foram analisados em eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item 3.3.2.

3.6 Validação da PCR *multiplex*

Para a validação do ensaio de PCR *multiplex* foram analisadas 403 amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da doença diarreica aguda na infância, conduzido na cidade de São Paulo (SOBEL et al., 2004). As amostras de *E. coli* foram previamente avaliadas quanto à presença de marcadores de virulência que definem os patótipos de DEC (EPEC, ETEC, EIEC e STEC). Dentro da população estudada, as amostras de 200 casos e 200 controles pareados, selecionados aleatoriamente, tiveram os seus padrões de adesão determinados em ensaios com células HeLa, classificando assim as EAEC e DAEC (GOMES et al., 1998). As EAEC foram posteriormente analisadas quanto à presença do gene *aggR*, definindo os subgrupos típica e atípica (ELIAS et al., 2002).

Dessa forma, a coleção de *E. coli* avaliada pela PCR *multiplex* incluiu amostras de casos e controles classificadas como EPEC (típica e atípica), ETEC, EHEC, EIEC, DAEC, EAEC (típica e atípica), ou como desprovidas de marcadores de virulência que definem *E. coli* diarreiogênicas (amostras não patogênicas). O ensaio desenvolvido no presente estudo foi então aplicado às cegas nessa coleção, ou seja, sem o conhecimento da classificação prévia das amostras para os cálculos de sensibilidade e especificidade.

Dessa forma, o total de 403 amostras selecionadas (198 de casos e 205 de controles) compreenderam 32 amostras de EPEC (14 típicas e 18 atípicas), 17 de

ETEC, 16 de EIEC, 81 DAEC, 58 EAEC (39 típicas e 19 atípicas) e 199 amostras sem marcadores de virulência de DEC e não aderente em células epiteliais.

Os resultados da PCR *multiplex* foram confrontados com os dados individuais de cada amostra com relação à classificação ou não em patótipos de DEC. Os cálculos de especificidade, sensibilidade e de valor preditivo (de um teste positivo ou negativo) foram realizados segundo as seguintes fórmulas descritas por Crowther (2001):

$$\text{Sensibilidade} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN}) \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP}) \times 100$$

$$\text{Valor preditivo do teste positivo} = [\text{VP} / (\text{VP} + \text{FP})] \times 100$$

$$\text{Valor preditivo do teste negativo} = [\text{VN} / (\text{VN} + \text{FN})] \times 100$$

Onde:

VP: verdadeiros positivos

VN: verdadeiros negativos

FN: falsos negativos

FP: falsos positivos

As amostras de EAEC caracterizadas a partir da expressão do padrão AA em células HeLa foram consideradas como “verdadeiros positivos” quando detectadas no ensaio, ou seja, a expressão do padrão AA foi considerada como o padrão ouro para o diagnóstico de EAEC.

4 RESULTADOS

4.1 Frequência dos genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*

Os genes *aaiA*, *aaiC* e *aaiG*, cujos produtos compõem um sistema de secreção do tipo VI, e *aaiU* que codifica uma proteína hipotética, fazem parte de uma PAI inserida em *pheU* no cromossomo da amostra EAEC 042. Devido a sua localização, os genes dessa PAI têm potencial como bons marcadores para EAEC com ou sem o plasmídeo pAA, ou seja, tanto para EAEC típica como atípica. Esses quatro genes foram escolhidos na intenção de selecionar dois deles para a montagem da PCR *multiplex*, juntamente com os genes *aggR* e *aatA*, (plasmidiais) determinados em outros estudos como específicos para EAEC típica.

Inicialmente, as PCR foram padronizadas empregando como controle positivo o DNA da amostra protótipo de EAEC 042. Conforme apresentado na figura 2, houve amplificação de um único fragmento no tamanho esperado em cada uma das reações, ou seja, 476 pb para *aaiA*, 308 pb para *aaiC*, 782 pb para *aaiG* e 806 pb para *aaiU*.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR para detecção de *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*. (A) Amplificação do gene *aaiA*. Canaletas: 1 – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2 - amostra 042 (controle positivo); 3 - amostra DH5α (controle negativo). (B) Amplificação do gene *aaiC*. Canaletas: 1 – 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 2 - amostra DH5α; 3 - amostra 042. (C) Amplificação do gene *aaiG*. Canaletas: 1 – 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 2 - amostra 042; 3 - amostra DH5α. (D) Amplificação do gene *aaiU*. Canaletas: 1 – 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 2 - amostra 042; 3 - amostra DH5α.

Após a validação da detecção dos quatro genes através da PCR foi iniciada a etapa de pesquisa da frequência desses genes em outros patótipos de DEC, outras enterobactérias e em amostras de *E. coli* da microbiota. Nessa avaliação pretendia-se determinar a especificidade desses genes para EAEC.

Os resultados obtidos a partir das amostras DEC-IBu, Enterobac-IBu e Microbiota mostraram que os genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU* apresentam pouca ou nenhuma frequência nessas amostras. A tabela 4 apresenta os resultados obtidos para cada um dos genes, em cada uma das categorias de DEC separadamente, assim como, nas amostras de Enterobac-IBu e Microbiota.

Tabela 4 - Frequência dos genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG*, e *aaiU* em amostras de *E. coli* diarreio gênicas, *E. coli* da microbiota intestinal e outras enterobactérias

Gene	Nº (%) de amostras positivas							
	EIEC	ETEC	aEPEC	tEPEC	DAEC	STEC	EB	MI
	(n=17)	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=34)	(n=42)
<i>aaiA</i>	0	0	0	0	0	0	0	1 (2,4)
<i>aaiC</i>	0	1 (5)	1 (5)	0	0	0	0	0
<i>aaiG</i>	0	0	2 (10)	0	0	0	0	0
<i>aaiU</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

EIEC, *E. coli* enteroinvasora; ETEC, *E. coli* enterotoxigênica; aEPEC, *E. coli* enteropatogênica atípica; tEPEC, *E. coli* enteropatogênica típica; DAEC, *E. coli* de adesão difusa; STEC, *E. coli* produtora da toxina de Shiga; EB, Enterobactérias; MI, *E. coli* da microbiota intestinal.

No total de amostras em conjunto a frequência dos quatro genes foi de 2,1%. As quatro amostras em que algum dos genes pesquisados foi detectado estão listadas a seguir, com uma breve descrição de algumas de suas características.

O gene *aaiA* foi detectado em uma *E. coli* da microbiota intestinal (amostra BA253) a qual apresenta o padrão de adesão indefinido em células HeLa (ensaio de 6h) e não apresenta nenhum dos marcadores de virulência de DEC.

O gene *aaiC* foi detectado em uma ETEC (amostra 616, sorotipo O25:H16), a qual produz toxina ST; e em uma EPEC atípica (amostra BA1652, sorotipo O131:H4), que apresenta o padrão de adesão localizado *like* (LAL) em células HEp-2.

O gene *aaiG* foi detectado em duas EPEC atípicas: amostra BA1652 (também positiva para *aaiC*) e amostra BA2145 (sorotipo 0105:H7), a qual apresenta o padrão de adesão agregativo em células HEp-2.

Para confirmar a especificidade dos amplicons obtidos na PCR para os quatro genes, os respectivos produtos de amplificação da amostra 042 foram sequenciados, assim como os amplicons das amostras BA253 (*aaiA*), ETEC 616 (*aaiC*), BA1652 (*aaiC* e *aaiG*) e BA2145 (*aaiG*).

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com o banco de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Todas elas apresentaram identidade com os respectivos genes do genoma da EAEC 042 (CHAUDRHURI *et al.*, 2010). Os resultados dessas análises estão apresentados a seguir.

Com relação aos amplicons obtidos a partir da amostra EAEC 042 todas as sequências apresentaram alta identidade com as regiões estudadas dos respectivos genes da mesma amostra, ou seja, 100% para *aaiA* e *aaiC*, 99% para *aaiU* e 100% para *aaiG* (Figura 3).

A sequência de nucleotídeos do amplicon *aaiA* da amostra BA253 (Microbiota), apresentou 100% de identidade com a região de análise do respectivo gene da amostra EAEC 042.

Com relação aos amplicons da amostra BA1652 (EPEC atípica), a sequência de *aaiC* apresentou 100% de identidade com a região analisada do respectivo gene da amostra EAEC 042; e a sequência de *aaiG* apresentou 98% de identidade com a região de análise, também da amostra EAEC 042.

Já a sequência de nucleotídeos do amplicon *aaiC* da amostra ETEC 616 apresentou 94% de identidade com a região de análise do respectivo gene da amostra EAEC 042.

Finalmente, a sequência de nucleotídeos do amplicon *aaiG* da amostra BA2145 (aEPEC) apresentou 100% de identidade com a região de análise do respectivo gene da amostra EAEC 042.

Todas as sequências dos amplicons obtidos a partir do DNA da amostra EAEC 042 foram alinhadas com as sequências dos respectivos genes do genoma da amostra EAEC 042 depositadas no GeneBank, utilizando o programa *BioEdit*. A figura 3 (A-D) apresenta esses alinhamentos

042 aaiG

```

TAATTGTAAGTCTGGATTATCACCCGTAGTGTTAAGAATGGTAAAAAAG
      4900160    4900170    4900180    4900190    4900200
..|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
gi|284919779|emb|FN554766.1| E GAGAAGGTCATCAACTGGTTTTTGGATGATAAAGAAGGTGAGGAAAAAGTT
042 aaiG                       GAGAAGGTCATCAACTGGTTTTTGGATGATAAAGAAGGTGAGGAAAAAGTT

      4900210    4900220    4900230    4900240    4900250
..|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
gi|284919779|emb|FN554766.1| E ATAGTGACTTCATCTGGTGATTCTCTCCTGACTGTAAGAAGGATATGAT
042 aaiG                       ATAGTGACTTCATCTGGTGATTCTCTCCTGACTGTAAGAAGGATATGAT

      4900260    4900270    4900280    4900290    4900300
..|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
gi|284919779|emb|FN554766.1| E CAGCACTATTAAACCGCTCTATGTCGTTAACTATTGCTGAAGGGCGTAATG
042 aaiG                       CAGCACTATTAAACCGCTCTATGTCGTTAACTATTGCTGAAGGGCGTAATG

      4900310    4900320    4900330    4900340    4900350
..|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
gi|284919779|emb|FN554766.1| E CTGAAATAAAAAGAGGGAATGACAGGCCTTGTTCTTAAAGAAGGTGACCTA
042 aaiG                       CTGAAATAAAA-GAGGGAATGACAGGCCTTGTTCTTAAAGAAGGTGACCTA

      4900360    4900370
..|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
gi|284919779|emb|FN554766.1| E CATAATGATGTACATGGTAATAT
042 aaiG                       CATAATGATGTACATGGTAATAT

```

(b)

(b)

	4915950	4915960	4915970	4915980	4915990
gi 284919779 emb FN554766.1 E	.. ..	CTCATGTTACGGCCACTCAGATGCGGACGAATATTCTTATCTGGTATATT			
042 aaiU		CTCATGTTACGGCCACTCAGATGCGGACGAATATTCTTATCTGGTATATT			
	4916000	4916010	4916020	4916030	4916040
gi 284919779 emb FN554766.1 E	.. ..	AAAAATGTTATTCTGCTATGCAAAGCTGCCTGATGATGAGAAAACTTA			
042 aaiU		AAAAATGTTATTCTGCTATGCAAAGCTGCCTGATGATGAGAAAACTTA			
	4916050	4916060	4916070	4916080	4916090
gi 284919779 emb FN554766.1 E	.. ..	CTCGTCATTAACCTTGCTGGAGGATGCATTAAACATTATTGGCTGATCTCG			
042 aaiU		CTCGTCATTAACCTTGCTGGAGGATGCATTAAACATTATTGGCTGATCTCG			
	4916100	4916110	4916120	4916130	4916140
gi 284919779 emb FN554766.1 E	.. ..	AATACAATCTTCTTTCTGGCAAATTTTTTATCGTTTCAGATATGCTGGCT			
042 aaiU		AATACAATCTTCTTTCTGGCAAATTTTTTATCGTTTCAGATATGCTGGCT			
	4916150	4916160	4916170	4916180	4916190
gi 284919779 emb FN554766.1 E	.. ..	GAACTCAAGAGACAAAAGAGTGATGACTCAGAAAGTACTGATGCCGCACA			
042 aaiU		GAACTCAAGAGACAAAAGAGTGATGACTCAGAAAGTACTGATGCCGCACA			
	4916200	4916210	4916220	4916230	4916240
gi 284919779 emb FN554766.1 E	.. ..	TCATGATTACGGATCACATGATGCGAAAGATATTCGGTCTTTTAGCAGTG			
042 aaiU		TCATGATTACGGATCACATGATGCGAAAGATATTCGGTCTTTTAGCAGTG			
	4916250	4916260	4916270	4916280	4916290
gi 284919779 emb FN554766.1 E	.. ..	GTTTACCTACGAATATTGACTCCAATTATACCTGCTGGACCAGAACAAT			
042 aaiU		GTTTACCTACGAATATTGACTCCAATTATACCTGCTGGACCAGAACAAT			
	4916300	4916310	4916320	4916330	4916340
gi 284919779 emb FN554766.1 E	.. ..	ACGTTAATTAAGAAAGATAAGAAACTGCGCATATATTATAACGTCGTTTC			
042 aaiU		ACGTTAATTAAGAAAGATAAGAAACTGCGCATATATTATAACGTCGTTTC			
	4916350	4916360	4916370	4916380	4916390
	.. ..				

```

gi|284919779|emb|FN554766.1| E TTTCATATCGGGTGCTCTAATAACCGTTGTAATGAACTATGCTGGCAGGC
042 aaiU TTTCATATCGGGTGCTCTAATAACCGTTGTAATGAACTATGCTGGCAGGC

4916400 4916410 4916420 4916430 4916440
..|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
gi|284919779|emb|FN554766.1| E CGGAAACAGTACTGAAACTTAGGGGCATCATACCTGATAGCTTTATTACT
042 aaiU CGGAAACAGTACTGAAACTTAGGGGCATCATACCTGATAGCTTTATTACT

4916450 4916460 4916470 4916480 4916490
..|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
gi|284919779|emb|FN554766.1| E GAAATGGTTATGAACTATTCTGGATGTTTCAGTCTCCCTCCCTAATTCAGC
042 aaiU GAAATGGTTATGAACTATTCTGGATGTTTCAGTCTCCCTCCCTAATTCAGC

4916500 4916510 4916520 4916530 4916540
..|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
gi|284919779|emb|FN554766.1| E AGACTCCTGGTCTAAGCTTGGAAGAAGATTGATGATTTACGGAAACAC
042 aaiU AGACTCCTGGTCTAAGCTTGGAAGAAGATTGATGATTTACGGAAACAC

4916550 4916560 4916570
..|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
gi|284919779|emb|FN554766.1| E TGAATGTAATTGAAAATGATGGGGGG
042 aaiU TGAATGTAATTGAAAATGATGGGGGG

```

Figura 3 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos parciais dos genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*. As sequências foram amplificadas a partir do DNA da amostra protótipo EAEC 042. (A) alinhamento da sequência de nucleotídeo do amplicon *aaiA* com a sequência disponível no BLAST da amostra 042 (FN554766); (B) alinhamento da sequência de nucleotídeos do amplicon *aaiC* com a sequência disponível no BLAST da amostra 042 (FN554766); (C) alinhamento da sequência de nucleotídeos do amplicon *aaiG* com a sequência disponível no BLAST da amostra 042 (FN554766); (D) alinhamento da sequência de nucleotídeos do amplicon *aaiU* com a sequência disponível no BLAST da amostra 042 (FN554766).

Uma vez determinada a especificidade de todos os produtos amplificados pela PCR, a etapa seguinte deste estudo correspondeu à avaliação da frequência dos quatro genes dessa PAI em amostras de EAEC típicas e atípicas. Para isso foi empregada a coleção de amostras denominada EAEC-EPM.

Os resultados obtidos mostraram que os quatro genes apresentam uma frequência significativa em amostras de EAEC, principalmente nas amostras típicas, sendo que os genes *aaiA* e *aaiG* apresentaram os melhores resultados em ambos os grupos. No total de 103 amostras foi observada a frequência de 45,6% para o gene *aaiA*, 42,7% para o gene *aaiG*, 38,8% para o gene *aaiC* e 19,4% para o gene *aaiU*. Ao analisar essas frequências nos grupos típica e atípica separadamente, *aaiA* e *aaiG* também foram os genes mais frequentes e todos os valores foram inferiores no grupo das EAEC atípicas (Figura 4).

Figura 4 - Frequência dos genes cromossômicos. O gráfico demonstra a frequência dos genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG*, e *aaiU* em amostras de EAEC típica e atípica.

Em seguida, esses mesmos resultados foram analisados quanto às possíveis combinações dos quatro genes presentes em cada amostra. Conforme apresentado na tabela 5, houve uma grande diversidade de perfis genéticos em ambos os grupos e somente 10 amostras (9 típicas e 1 atípica) apresentaram os quatro genes pesquisados.

Tabela 5 - Perfis genéticos das amostras de EAEC típicas e atípicas com relação aos genes *aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*

Combinações genéticas	Nº (%) de amostras positivas	
	EAEC típica (n=54)	EAEC atípica (n=49)
<i>aaiA</i>	0	1 (2)
<i>aaiC</i>	4 (7,4)	5 (10,2)
<i>aaiG</i>	0	0
<i>aaiU</i>	0	1 (2)
<i>aaiA-aaiC</i>	0	1 (2)
<i>aaiA-aaiG</i>	1 (1,8)	1 (2)
<i>aaiA-aaiU</i>	0	0
<i>aaiC-aaiG</i>	0	1 (2)
<i>aaiC-aaiU</i>	1 (1,8)	0
<i>aaiG-aaiU</i>	0	1 (2)
<i>aaiA-aaiC-aaiG</i>	14 (25,9)	4 (8,2)
<i>aaiA-aaiC-aaiU</i>	2 (3,7)	0
<i>aaiA-aaiG-aaiU</i>	4 (7,4)	2 (4,1)
<i>aaiC-aaiG-aaiU</i>	0	0
<i>aaiA-aaiC-aaiG-aaiU</i>	9 (16,7)	1 (2)
Nenhum dos 4 genes	21 (38,9)	28 (57,1)

Com o objetivo de determinar a porcentagem de detecção de EAEC quando apenas dois desses quatro genes fossem unidos na PCR *multiplex*, as amostras positivas para cada uma das possíveis combinações de genes, apresentadas na tabela 4, foram analisadas quanto à presença de pelo menos um dos genes de cada dupla possível, ou seja, *aaiA* e/ou *aaiG*, *aaiA* e/ou *aaiC*, *aaiA* e/ou *aaiU*, *aaiC* e/ou *aaiU*, *aaiC* e/ou *aaiG* e *aaiU* e/ou *aaiG*. Essa análise considerou a tentativa de empregar dois desses genes em combinação na PCR *multiplex*. Do total de 103 amostras *aaiA* e/ou *aaiG* foram detectados em 42, *aaiA* e/ou *aaiC* em 51, *aaiA* e/ou *aaiU* em 43, *aaiC* e/ou *aaiU* em 50, *aaiC* e/ou *aaiG* em 51 e *aaiU* e/ou *aaiG* em 42 amostras.

Desse modo a utilização do gene *aaiC* junto a *aaiA* ou *aaiG* seriam boas opções para compor a PCR *multiplex* para a detecção de EAEC de ambos os grupos. Entretanto, os iniciadores para *aaiC* utilizados neste estudo amplificam um fragmento de 278 pb, o que o deixaria muito próximo ao amplicon do gene *aggR* (346 pb) na eletroforese em gel de agarose. Além disso, *aaiC* foi detectado em uma amostra de EPEC atípica e em uma de ETEC. Por outro lado, os genes *aaiA* e *aaiG* foram os mais prevalentes em ambos os grupos de EAEC (45,6% para *aaiA* e 42,7% para *aaiG*) e em conjunto detectariam 42 amostras (30 típicas e 12 atípicas), resultados promissores para a composição da PCR *multiplex* junto aos genes plasmidiais *aatA* e *aggR*.

4.2 PCR *multiplex* utilizando os genes *aaiA*, *aaiG*, *aggR* e *aatA*

Os genes *aggR* e *aatA* já foram utilizados por outros autores como alternativa para diagnóstico molecular de EAEC através de PCR *multiplex*, porém em conjunto com o gene *aap* (dispersina), o que diminui a especificidade do teste considerando que *aap* não é exclusivo de EAEC (MONTEIRO et al., 2009).

Há descrição na literatura de iniciadores para o gene *aggR* que têm sido amplamente utilizados com sucesso em diversos estudos, amplificando um fragmento de 308 pb em ciclo de amplificação com temperatura de anelamento de 50°C. Dessa forma os iniciadores utilizados para os genes *aaiA*, *aaiG* e *aatA* foram testados nos ciclos de amplificação descritos na tabela 2, mas com temperatura de

anelamento de 50°C. Entretanto, os iniciadores para os genes *aaiG* e *aatA* não anelaram ou geram fragmentos de DNA inespecíficos, inviabilizando a utilização dessa temperatura no ciclo de amplificação.

Por esse motivo foram realizados ensaios de padronização com os iniciadores descritos na literatura para o gene *aggR* (CZECZULIN et al., 1999) em temperaturas de anelamento maiores do que 50°C e os resultados foram negativos, ou seja, não houve amplificação de fragmentos.

Dessa forma, novos iniciadores para o gene *aggR* foram desenhados neste estudo, com base na sequência da amostra protótipo EAEC 042 (Número de acesso no GenBank: FN554767). As sequências destes iniciadores estão descritas na tabela 3. Esses novos iniciadores de *aggR* foram eficientes na temperatura de anelamento de 56 °C, permitindo a utilização na PCR *multiplex*. A figura 5 ilustra a amplificação de um único fragmento específico de 346 pb, tamanho esperado para estes iniciadores.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto da PCR para detecção de *aggR*. Canaletas: 1 - 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); 2 - amostra 042 (controle positivo); 3 - amostra DH5 α (controle negativo).

O amplicon correspondente a esses novos iniciadores para *aggR* foi sequenciado e a sua sequência analisada mostrando 99% de identidade com o mesmo fragmento da sequência de *aggR* da amostra EAEC 042 depositada no

GeneBank (número de acesso: FN554767). A figura 6 mostra a sequência de 320 nucleotídeos obtida para o gene *aggR*, alinhada com a respectiva sequência da amostra protótipo 042 depositada no GeneBank.

```

                                41320      41330      41340      41350      41360
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gi|284924582|emb|FN554767.1| E TAAATTCATCTGCAATAATAGCTAGAGTCCATCTCTTTGATAAGTCTTTC
042 aggR TAAATTCATCTGCAATAATAGCTAGAGTCCATCTCTTTGATAAGTCTTTC

                                41370      41380      41390      41400      41410
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gi|284924582|emb|FN554767.1| E TCGATTATGTTTCTGACTTTATCAGAAAAGAAGCTTACAGCCGATATATA
042 aggR TCGATTATGTTTCTGACTTTATCAGAAAAGAAGCTTACAGCCGATATATA

                                41420      41430      41440      41450      41460
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gi|284924582|emb|FN554767.1| E AATTGACTCTATAATTTTTTTGTTGTTTTCGATCTTTGATATAAGATATA
042 aggR AATTGACTCTATAATTTTTTTGTTGTTTTCGATCTTTGATATAAGATATA

                                41470      41480      41490      41500      41510
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gi|284924582|emb|FN554767.1| E TCAAATCTGAAGTAATTCTTGAATCATCATTATTATCGATACTCTTGAAT
042 aggR TCAAATCTGAAGTAATTCTTGAATCATCATTATTATCGATACTCTTGAAT

                                41520      41530      41540      41550      41560
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gi|284924582|emb|FN554767.1| E GTATCTAATACAGAATCGTCAGCATCAGCTACAATTATTCCTTTTGACCA
042 aggR GTATCTAATACAGAATCGTCAGCATCAGCTACAATTATTCCTTTTGACCA

                                41570      41580      41590      41600      41610
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gi|284924582|emb|FN554767.1| E ATTCGGACAAC TACAAGCATCTACTTTTGATATCCGTATATTATCATCA
042 aggR ATTCGGACAAC TACAAGCATCTACTTTTGATATCCGTATATTATCATCA

                                41620      41630      41640
                                ....|....|....|....|....|....|
gi|284924582|emb|FN554767.1| E GGGCATCCTTTAGGCGTCTTAATGTATCG
042 aggR GGGCATCCTTTAGGCGTCTTAATGTATCG

```

Figura 6 - Alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos do gene *aggR*. Sequência do amplicon *aggR* deste estudo e a correspondente sequência parcial do gene *aggR* da amostra protótipo EAEC 042 (Nº de acesso no GenBank: FN554767).

Uma vez que os resultados apontaram para a escolha dos genes cromossômicos *aaiA* e *aaiG*, a etapa seguinte deste estudo constituiu na padronização da detecção simultânea de *aatA*, *aggR*, *aaiA* e *aaiG*. Primeiramente foram avaliadas diferentes temperaturas de anelamento entre 54 e 58°C e foi observado que na temperatura de anelamento de 56 °C os quatro genes em conjunto foram amplificados separadamente de maneira correta.

Em seguida foi determinada a concentração ideal de iniciadores na reação, realizando uma titulação de diferentes concentrações desses iniciadores para cada um dos genes separadamente. As seguintes concentrações em pmol foram

utilizadas: 10 pmol, 20 pmol, 30 pmol, 40 pmol, 50 pmol, 60 pmol, 70 pmol, 80 pmol, 90 pmol e 100 pmol, obtendo-se fragmentos específicos nas concentrações de 20 pmol para *aaiA*, *aaiG* e *aggR* e de 50 pmol para *aatA* (Tabela 6).

Tabela 6 - Sequências dos iniciadores, ciclo de amplificação e concentração (pmol) dos iniciadores utilizados na PCR *multiplex*

Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Concentração dos iniciadores	Ciclo de amplificação	Referências
<i>aaiA</i>	(F) CCCACGACCAGATAACG (R) GTTTTCAGGATTGCCATTAG	20 pmol		Dudley <i>et al.</i> (2006b)
<i>aaiG</i>	(F) GGGAGTGTTTCAGTCTGGAC (R) ATTTGTCACAAGCTCAGCAT	20 pmol		Este estudo
<i>aggR</i>	(F) CGATACATTAAGACGCCTAA AG (R) TCTGATACATTAAATTCATCT GC	20 pmol	30x: 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 72 °C/7 min	Este estudo
<i>aatA</i>	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCAT (R) CAATGTATAGAAATCCGCTG TT	50 pmol		Schmidt <i>et al.</i> (1995)

(F) iniciador *forward*; (R) iniciador *reverse*.

Inicialmente, a PCR *multiplex* foi padronizada empregando como controle positivo o DNA das amostras protótipo de EAEC 042 e 17-2, ambas positivas para os quatro genes. Conforme apresentado na figura 7, houve amplificação dos quatro fragmentos nos tamanhos esperados, ou seja, 782 pb para *aaiG*, 630 pb para *aatA*, 476 pb para *aaiA* e 346 pb para *aggR*.

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR *multiplex* para detecção de *aaiG*, *aatA*, *aaiA* e *aggR*. Canaletas: 1 – 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); 2 – amostra 042; 3 – amostra 17-2; 4 – amostra DH5 α .

A fim de avaliar a concentração mínima de DNA detectável pela PCR *multiplex* (limite de detecção) foram realizadas reações com diferentes concentrações de DNA genômico purificado da amostra 042. Conforme apresentado na figura 8, utilizando entre 0,125 e 5 μ g de DNA, todos os genes foram amplificados. A partir de 0,1 μ g o gene *aggR* não foi mais detectado, enquanto os outros três genes continuaram sendo detectados. Desta forma, foi considerado como limite de detecção a concentração de 0,125 μ g (125 ng) de DNA genômico purificado da amostra EAEC 042

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR *multiplex* para detecção de *aaiG*, *aatA*, *aaiA* e *aggR* utilizando DNA purificado da amostra EAEC 042 em diversas concentrações. (A) Canaletas: 1 – 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 2 - 5 µg de DNA; 3 – 1 µg de DNA; 4 – 0,75 µg de DNA; 5 – 0,5 µg de DNA; 6 – 0,25 µg de DNA; 7- 0,125 µg de DNA. (B) Canaletas: 1 - 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); 2 - 0,1 µg de DNA; 3 – 0,075 µg de DNA; 4 – 0,05 µg de DNA; 5 – 0,025 µg de DNA; 6 – 0,0125 µg de DNA; 7 – 0,01 µg de DNA; 8 – amostra DH5α.

Em seguida a PCR *multiplex* foi aplicada nas amostras da coleção EAEC-EPM, com o objetivo de determinar a sua sensibilidade. A reação mostrou-se eficiente na detecção de EAEC típica e atípica. A figura 9 apresenta alguns exemplos de resultados da PCR *multiplex* empregando as condições de amplificação e concentrações de iniciadores descritas na tabela 6. A reação apresentou a amplificação correta dos quatro amplicons na amostra protótipo 042 (canaleta 19) e ausência de amplificação no controle negativo (canaleta 18). Algumas amostras representativas de EAEC típica e atípica foram incluídas neste gel de agarose, demonstrando a possibilidade de amplificação de um ou vários amplicons.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR *multiplex* com amostras representativas de EAEC típicas e atípicas. Canaletas: 1 – 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); 2 – amostra 1031-4 (EAEC-EPM); 3 – amostra 1091-1 (EAEC-EPM); 4 - amostra 1191-1 (EAEC-EPM); 5 – amostra 2051-1 (EAEC-EPM); 6 – amostra 2351-1 (EAEC-EPM); 7 – amostra 3201-2 (EAEC-EPM); 8 – amostra 3301-1 (EAEC-EPM); 9 – amostra 3531-3 (EAEC-EPM); 10 - amostra 3621-2 (EAEC-EPM); 11 – amostra 3641-2 (EAEC-EPM); 12 – amostra 3701-1 (EAEC-EPM); 13 – amostra 3861-1 (EAEC-EPM); 14 – amostra 4081-1 (EAEC-EPM); 15 – amostra 4311-6 (EAEC-EPM); 16 – amostra 4691-2 (EAEC-EPM); 17 – 4981-1; 18 – DH5α (controle negativo); 19 – amostra 042 (controle positivo).

Os resultados obtidos com a PCR *multiplex* aplicada em todas as amostras EAEC-EPM estão apresentados na figura 10. A positividade do teste foi considerada quando pelo menos um dos quatro genes foi detectado.

Figura 10 - Avaliação da detecção de EAEC típicas e atípicas pela PCR *multiplex*. O gráfico demonstra a detecção das amostras de EAEC típica e atípica, através da PCR *multiplex*.

Pode-se observar que todas as amostras de EAEC típicas da coleção EAEC-EPM foram detectadas a partir da PCR *multiplex*. Com relação às amostras de EAEC atípicas, 24 (49%) foram detectadas pelo teste padronizado.

4.3 Sensibilidade e especificidade da PCR *multiplex*

As 403 amostras de *E. coli* fecais pertencentes a patótipos de *E. coli* diarreiogênica (EPEC, ETEC, EIEC, DAEC, EAEC) e sem marcadores de virulência de DEC e não aderente em células HEp-2 foram analisadas quanto à reatividade com a PCR *multiplex* às cegas, ou seja, sem conhecimento da classificação prévia em termos de patótipos. Os testes foram realizados segundo a descrição apresentada na tabela 6.

Do total de amostras analisadas 74 (18,4%) foram detectadas pelo ensaio de PCR *multiplex*, considerando como teste positivo a presença de pelo menos um dos quatro genes. Cabe salientar que não houve diferença quanto à origem das amostras, ou seja, 38 foram isoladas de casos e 36 de controles. Dessa forma, todos os resultados foram analisados sem essa distinção.

A maioria das amostras positivas (55 ou 74,3%) pertencia à categoria EAEC, incluindo as típicas (*aggR+*) e atípicas (*aggR-*). Entretanto, algumas amostras de outros patótipos e amostras desprovidas de marcadores de *E. coli* diarreiogênicas (19 ou 25,7%) também foram detectadas pelo ensaio (Tabela 7).

Tabela 7 - Classificação das 74 amostras de *E. coli* fecais positivas no ensaio de PCR *multiplex*

Classificação das amostras de <i>E. coli</i> fecais	Nº (%) de amostras positivas na PCR <i>multiplex</i>
EAEC típica	39 (52,7)
EAEC atípica	16 (21,6)
DAEC	3 (4,1)
EPEC	4 (5,4)
Não patogênicas*	12 (16,2)

*Foram consideradas aquelas amostras que não apresentam marcadores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas e/ou padrão de adesão em células HEp-2 não característico ou não aderente.

Dentre as 58 amostras de EAEC incluídas no total de amostras analisadas no teste, 55 (94,8%) foram detectadas, incluindo 39 típicas (100%) e 16 (84,2%) atípicas.

A análise dos resultados das amostras positivas no ensaio de PCR *multiplex* mostrou que os quatro genes foram detectados em diversas combinações (Tabela 8).

As EAEC típicas detectadas apresentaram os perfis: *aaiG/aatA/aaiA/aggR*, *aatA/aggR* e *aaiA*. As EAEC atípicas foram detectadas pelos seguintes perfis: *aaiG/aatA/aaiA*, *aaiG/aaiA* e *aatA*.

Dentre as atípicas detectadas pelo teste, 10 foram positivas para os genes cromossômicos *aaiA* e *aaiG* somente, desse modo se fossem utilizados apenas os genes plasmidiais *aggR* e *aatA* essas amostras não seriam detectadas, sendo assim, houve um aumento de 60% na detecção de EAEC atípica, com a inserção desses marcadores cromossômicos.

As amostras não classificadas como EAEC e detectadas pelo ensaio apresentaram as seguintes combinações de genes: 8 amostras positivas para *aaiG/aaiA* (1 DAEC e 7 não patogênicas) e 11 amostras positivas apenas para *aaiA* (2 DAEC, 4 EPEC e 5 não patogênicas). É importante mencionar que a combinação *aaiG/aaiA* foi também detectada em 10 EAEC, mas a detecção isolada de *aaiA* ocorreu em apenas uma EAEC, ao passo que detectou 11 amostras não EAEC.

Tabela 8 - Combinações de genes detectados das 74 amostras de *E. coli* fecais positivas no ensaio de PCR *multiplex* e suas classificações

Combinações de genes detectados	Nº (%) de amostras positivas	Classificação das amostras (Nº de amostras positivas)
<i>aaiG, aatA, aaiA, aggR</i>	20 (26,7)	tEAEC (20)
<i>aatA, aggR</i>	18 (25,3)	tEAEC (18)
<i>aaiG, aaiA</i>	18 (24)	aEAEC (10), DAEC (1), não patogênica (7)
<i>aaiA</i>	12 (16)	tEAEC (1), DAEC (2), EPEC (4), não patogênica (5)
<i>aatA</i>	5 (6,7)	aEAEC (5)
<i>aaiG, aatA, aaiA</i>	1 (1,3)	aEAEC (1)

* tEAEC, *E. coli* enteroagregativa típica; aEAEC, *E. coli* enteroagregativa atípica; *E. coli* não patogênicas, aquelas amostras que não apresentam marcadores de virulência de *E. coli* diarréiogênicas e/ou padrão de adesão em células HEp-2 não característico ou não aderente.

Em seguida, de posse desses resultados em confronto com os dados de padrões de adesão em células HeLa e da presença de marcadores de virulência de patótipos de *E. coli* diarreiogênicas, foi possível calcular os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo do teste negativo e valor preditivo do teste positivo.

Os verdadeiros positivos (VP) incluíram as amostras de EAEC classificadas a partir da expressão do padrão agregativo em células HEp-2, uma vez que esse é o teste considerado padrão ouro para o diagnóstico de EAEC (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011), e que foram detectadas pela PCR *multiplex*. Cinquenta e cinco amostras foram consideradas como VP (30 de casos e 25 de controles).

Os verdadeiros negativos (VN) incluíram as amostras que não apresentaram padrão de adesão agregativo em células HEp-2 e não foram detectados pela PCR *multiplex*. Trezentas e vinte e seis amostras foram consideradas VN (160 de casos e 166 de controles).

Os falsos negativos (FN) incluíram as amostras que apresentam padrão de adesão agregativo em células HEp-2, mas não foram detectadas pela PCR *multiplex*. Três amostras de controles foram consideradas FN.

Os falsos positivos (FP) incluíram as amostras que apresentam padrões de adesão diferentes do agregativo (difuso, localizado, localizado-*like*, não característico ou não aderente) e que foram detectadas na PCR *multiplex*. Dezenove amostras foram consideradas FP (8 de casos e 11 de controles).

Dessa forma, o ensaio de PCR *multiplex* desenvolvido neste estudo apresentou sensibilidade de 94,8%, especificidade de 94,5%, valor preditivo de teste positivo de 74,3% e valor preditivo de teste negativo de 99,1%.

5 DISCUSSÃO

EAEC é considerada um enteropatógeno emergente por diversos autores, devido a sua associação com diarreia aguda e persistente em crianças e adultos, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, bem como a surtos de diarreia e a diarreia do viajante (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; HARRINGTON et al., 2006; HUANG et al., 2006).

Os aspectos genotípicos e fenotípicos de virulência mostram que EAEC é um patótipo heterogêneo, ou seja, não há um marcador comum a todas as amostras que compõem o grupo, dificultando a compreensão da sua patogênese (BOISEN et al., 2012; CZECHULIN et al., 1999; HUANG et al., 2007; NATARO, 2005; VILA et al., 2000). Nesse sentido houve a proposta de subdivisão do patótipo EAEC nos grupos típica e atípica, partindo da premissa de que o grupo das típicas seria constituído de amostras com maior potencial de virulência visto que albergam um maior número de genes de virulência sob regulação de AggR (NATARO, 2005; SARANTUYA et al., 2004).

Contudo, vários estudos epidemiológicos apontam que a frequência de EAEC atípica como agente de diarreia aguda é significativa, em alguns casos superior a de EAEC típica (Tabela 1). Além disso, uma amostra de EAEC atípica foi responsável por um surto hospitalar de diarreia na Sérvia (COLBEJIC et al., 1996; DUDLEY et al., 2006a).

Esses estudos empregaram diferentes metodologias para classificar as bactérias como EAEC, mas em todos houve a detecção do gene *aggR*. Resumidamente, EAEC atípica foi detectada em frequências superiores a EAEC típica (HUANG et al., 2003; HUANG et al., 2007; MONFARDINI, 2012), similares (JIANG et al., 2002) ou inferiores (ARAUJO et al., 2007; ASLANI et al., 2010; BOISEN et al., 2012; ELIAS et al., 2002; ZAMBONI et al., 2004).

Nesses estudos nota-se que a metodologia utilizada para a classificação das amostras interfere no resultado da frequência de EAEC atípica. Por exemplo, Araujo et al. (2007) utilizaram *aatA* como sonda genética para a detecção de EAEC obtendo então 100% de amostras típicas. Porém, outros autores que utilizaram a sonda CVD432 (*aatA*) em conjunto com o ensaio de adesão em células epiteliais (HeLa ou

HEp-2) detectaram EAEC atípica (ASLANI et al., 2010; GOMES et al., 1998). Já nos estudos em que as EAEC atípicas foram mais frequentes do que EAEC típicas a metodologia utilizada foi o teste de adesão em células epiteliais (JIANG et al., 2002; HUANG et al., 2003; HUANG et al., 2007).

Tendo em vista que a frequência de EAEC atípica é significativa, inclusive em nosso meio (CORDEIRO et al., 2008; GIOPPPO et al., 2000; GOMES et al., 1998; MONFRADINI, 2012; PIVA 2003; LIMA et al., 2013b; ZAMBONI et al., 2004), torna-se necessário que essas cepas também sejam detectadas.

O diagnóstico de EAEC considerado como padrão ouro é a observação da expressão do fenótipo de adesão agregativa em células HeLa ou HEp-2 (NATARO; KAPER; 1998). Porém, como já mencionado anteriormente, esse ensaio demanda de infraestrutura laboratorial específica disponível apenas em laboratórios de referência. Por esse motivo surgiram alguns diagnósticos moleculares para EAEC, como tentativa para substituir os ensaios de adesão.

Dentre eles destacam-se os testes de PCR que se fundamentam na detecção de fatores de virulência associados à EAEC. Alguns utilizam a PCR *multiplex* detectando simultaneamente mais de um marcador de virulência desse patótipo (CERNA et al., 2003; JENKINS et al., 2006b; RÜTTLER et al., 2006). Entretanto, como no ensaio descrito por Cerna et al. (2003), somente marcadores plasmidiais são detectados, o que não permite a detecção de EAEC atípicas. Além disso, o gene *aap* utilizado por esses autores não é específico para EAEC (MONTEIRO, et al., 2009). Já no teste descrito por Jenkins et al. (2006b) foram utilizados genes plasmidiais e cromossômicos (presentes na PAI *pheU*) associados a EAEC, mas esses autores incluíram o gene *astA* (enterotoxina EAST-1) que é altamente prevalente em outros patótipos de DEC, bem como em outras enterobactérias (SAVARINO et al., 1996).

Dessa forma, no presente estudo foram selecionados quatro genes cromossômicos (*aaiA*, *aaiC*, *aaiG* e *aaiU*) de uma PAI descrita na amostra protótipo de EAEC 042 (DUDLEY et al., 2006) para a escolha de pelo menos dois dentre eles que fossem específicos e frequentes em EAEC. Esses dois genes seriam então, em conjunto com *aggR* e *aatA*, usados em uma PCR *multiplex* para a detecção de EAEC típica e atípica.

A PAI que contém esses genes apresenta 117 kb, está inserida no *locus* do tRNA *pheU* no cromossomo da amostra 042 e apresenta 25 genes (de *aaiA* até *aaiY*) (DUDLEY et al., 2006). Muitos desses genes apresentam homologia com genes de outras bactérias Gram negativas que possuem um sistema de secreção do tipo VI, tal como *lcmF-Associated Homologous Proteins* (IAHP) em *Vibrio cholerae* (PUKATZKI et al., 2006).

A contribuição dos produtos dos genes *aai* na patogênese de EAEC ainda é desconhecida, porém essas proteínas aparentemente não têm papel na aderência da bactéria a superfícies abióticas ou das células epiteliais intestinais, como ocorre com outros genes regulados por AggR (BOISEN et al., 2012; HARRINGTON et al., 2006; JENKINS et al., 2006a; LIMA et al., 2013a; TANIUCHI et al., 2012).

Diversos estudos mostraram que *aaiA* e *aaiC* são comumente encontrados em isolados de EAEC, particularmente em amostras de EAEC típica, o que sustenta a hipótese de que o sistema de secreção do tipo VI seja um mediador da patogenicidade dessas bactérias (DUDLEY et al., 2006).

Alguns autores já utilizaram genes da PAI inserida em *pheU* como uma tentativa de detecção molecular de EAEC. Jenkis et al. (2006a) utilizaram no ensaio de PCR o gene *aaiA*, além de outros genes cromossômicos, com o objetivo de caracterizar um perfil genético para amostras de EAEC. O gene *aaiA* foi detectado em 48,9% das amostras de EAEC e em 3% das não classificadas como EAEC, demonstrando sua alta frequência nesse patótipo de DEC. Em outro estudo Jenkis et al. (2006b) realizaram uma PCR *multiplex* contendo também o gene *aaiA* e detectaram 36% de amostras positivas para este gene.

Recentemente Boisen et al. (2012) descreveram quatro distintas PCR *multiplex* que detectam 21 potenciais genes de virulência de EAEC, entre eles os genes plasmidiais *aggR*, *aatA* e *aap* e o cromossômico *aaiC*. Porém, a PCR *multiplex* desse estudo teve como objetivo a caracterização genômica de uma coleção de EAEC isoladas de crianças com diarreia, não envolvendo diretamente o diagnóstico. Os genes *aggR*, *aatA* e *aaiC* foram detectados em 69,4%, 68,6% e 47,9% das amostras, respectivamente.

Assim, no presente estudo foram obtidos resultados semelhantes aos disponíveis na literatura, ou seja, *aaiA* esteve presente em 45,6% das EAEC, e o

gene *aaiC* em 38,8%. Já para os genes *aaiG* e *aaiU*, não há dados na literatura para comparação, mas foi observado que *aaiG* também tem uma boa frequência em amostras de EAEC (46% das amostras estudadas).

Entretanto, quando esses dados foram analisados separadamente com relação aos grupos de EAEC típicas e atípicas, os resultados mostraram frequências inferiores a 30% no grupo das atípicas. Por esse motivo outros genes cromossômicos foram pesquisados como alternativa para uma maior frequência em EAEC atípicas. Foram selecionados então os genes *air* e *pheU4529*, também localizados no cromossomo da EAEC 042 (CHAUDHURI et al., 2010; DUDLEY et al., 2006; SHEIKH et al., 2006).

O gene *air* está localizado em uma PAI inserida no tRNA *glyU* e codifica uma proteína que tem similaridade significativa com intiminas e invasinas (SHEIKH et al., 2006).

Para verificar a frequência do gene *air* nas amostras EAEC-EPM foram desenhados iniciadores de acordo com a sequência correspondente ao gene da amostra protótipo EAEC 042 (número de acesso no GenBank: FN554766) e estabelecida a PCR. Entretanto, não foi possível padronizar a reação mesmo utilizando diferentes ciclos de amplificação e concentrações de iniciadores e componentes da PCR. O fragmento amplificado (806 pb) foi sempre acompanhado de diversas bandas inespecíficas, tanto na amostra 042 como no controle negativo (dados não apresentados).

O outro gene escolhido (*pheU4529*) codifica uma proteína hipotética do sistema de secreção do tipo VI (DUDLEY et al., 2006). Esse gene foi escolhido porque dentre alguns avaliados por Jenkins et al. (2006a) foi o que apresentou a maior frequência nas amostras de EAEC atípica.

Para verificar a frequência do gene *pheU4529* nas amostras EAEC-EPM foram desenhados iniciadores de acordo com a sequência correspondente ao gene da amostra protótipo EAEC 042 (número de acesso no GenBank: FN554766) e estabelecida a PCR. Não houve diferença significativa entre os obtidos anteriormente com os genes *aaiG* e *aaiA*, ou seja, *pheU4529* foi detectado em 16 (32,6%) EAEC atípicas e em 25 (46,3%) típicas. Porém, na etapa de verificação da frequência desse gene nas coleções DEC-IBu, ENTEROBAC-IBu e Microbiota, a

PCR apresentou diversas bandas inespecíficas quando o gene de interesse estava presente (dados não apresentados).

Esses resultados inviabilizaram a utilização de ambos os genes em uma PCR *multiplex* para diagnóstico. Dessa forma o presente trabalho teve continuidade utilizando os genes *aaiA* e *aaiG* na composição da PCR *multiplex* em conjunto com os genes plasmidiais *aatA* e *aggR*.

Os genes *aggR* e *aatA* já tiveram suas frequências determinadas utilizando PCR *multiplex* como ferramenta para o diagnóstico desse patótipo, mostrando que esses genes são prevalentes em cepas de EAEC (ARANDA, et al., 2007; BOUZARI et al., 2005; CERNA et al., 2003; FUJIOKA et al., 2009; MÜLLER et al., 2007; RÜTLER et al., 2006; SAMIE et al., 2007; TOMA et al., 2002). Monteiro et al. (2009) em seu estudo verificaram também a prevalência dos genes *aatA* e *aggR* em outras amostras de DEC (com exceção de EAEC) e os mesmos não foram detectados, o que demonstra a especificidade desses genes em bactérias pertencentes a esta categoria. Por tal motivo esses dois genes plasmidiais foram utilizados para compor a PCR *multiplex* estabelecida junto aos genes cromossômicos *aaiA* e *aaiG*.

Recentemente diversos autores desenvolveram PCRs *multiplex* como alternativa de diagnóstico rápido e simultâneo para diversos patótipos de DEC, incluindo EAEC (ARANDA et al., 2004; ARANDA et al., 2007; GUION et al., 2008; FUJIOKA et al., 2009; LIMA et al., 2012; PANCHALINGAM et al., 2012; SOUZA et al., 2013; TANIUCHI et al., 2012; TOMA et al., 2003).

Empregando a detecção de vários marcadores de virulência, alguns desses estudos detectaram EAEC com base na presença do gene *aggR* (ARANDA et al., 2007; GUION et al., 2008; TOMA et al., 2003), *aatA* (ARANDA et al., 2004; BISCHOFF et al., 2005; SOUZA et al., 2013) ou de *aggR* e *astA* (FUJIOKA et al., 2009). Porém, *aggR* ou *aatA* detectam apenas EAEC típica (KAPER et al., 2004) e *astA* não é específico para EAEC (SAVARINO et al., 1996). Além disso, os resultados de Toma et al. (2003), mostraram claramente que a PCR *multiplex* usando apenas *aggR* não detectou amostras de EAEC atípica.

Outros ensaios do tipo *multiplex* para o diagnóstico de patótipos de DEC detectaram EAEC usando os genes *aatA* e *aaiC*, aumentando assim a detecção de

EAEC que não albergam o plasmídio pAA, devido à inclusão de *aaiC* (LIMA et al., 2012; PANCHALINGAM et al., 2012; TANIUCHI et al., 2012).

A PCR *multiplex* composta por *aaiA*, *aaiG*, *aatA* e *aggR* desenvolvida no presente trabalho foi avaliada inicialmente em uma coleção unicamente composta por amostras de EAEC, onde se mostrou uma excelente alternativa para a detecção dessas amostras. Isso pôde ser evidenciado pelos dados obtidos com a coleção EAEC-EPM, onde sem os marcadores cromossômicos a porcentagem de detecção seria 52,4% (54 EAEC típicas). Já com a inclusão dos marcadores cromossômicos essa taxa passou para 75,7% (54 EAEC típicas e 24 atípicas), ou seja, um aumento de 44,4% na detecção.

Em seguida o ensaio de PCR *multiplex* desenvolvido neste estudo foi avaliado na detecção de EAEC em uma grande coleção de amostras de *E. coli* fecais previamente classificadas como DEC ou não patogênicas, permitindo o cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos de teste positivo e negativo. Essa abordagem é pouco aplicada nos trabalhos de diagnóstico de EAEC descritos na literatura. Quando o valor de sensibilidade é citado, geralmente refere-se ao limite de detecção da técnica.

O teste aqui desenvolvido apresentou valores excelentes de sensibilidade (94,8%), especificidade (94,5%) e de valor preditivo de teste negativo (99,1%), ou seja, a chance de uma amostra realmente negativa tende a ser diagnosticada pelo teste como negativa. Não há muitos dados na literatura analisando a sensibilidade e a especificidade de ensaios de PCR para a detecção de EAEC. O ensaio de PCR *multiplex* empregando os genes *aggR*, *aatA* e *aap* (dispersina) descrito por Cordeiro et al. (2008) apresentou os valores de 93,5% de sensibilidade, 81% de especificidade e 95,3% de valor preditivo do teste negativo, semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Outros estudos descreveram ensaios de PCR *multiplex* (*aggR*, *aatA* e *aap*), mas não calcularam esses valores, uma vez que só empregaram amostras de EAEC, definidas pela expressão do padrão agregativo em células epiteliais cultivadas (BOUZARI et al., 2005; CERNA et al., 2003). No estudo de Taniuchi et al. (2012) os valores de sensibilidade e especificidade são descritos, entretanto, quando o ensaio é comparado na detecção de EAEC a partir de colônias isoladas, do cultivo em caldo de enriquecimento ou diretamente das fezes.

Já o valor preditivo de teste positivo, representando a chance de que uma amostra realmente positiva seja diagnosticada pelo teste como positiva, apresentou valor mais baixo que os outros indicadores (74,3%), mas semelhante (75,2%) ao obtido também no estudo de Cordeiro et al. (2008).

Esse valor foi mais baixo em decorrência das 19 amostras consideradas “falsos positivos”, ou seja, amostras de DAEC, EPEC e não patogênicas diagnosticadas pelo teste. Dentre elas, 11 apresentaram somente o gene *aaiA*, o qual foi detectado isoladamente em apenas uma EAEC. Dessa forma, o achado isolado de *aaiA* deve ser considerado com precaução. A análise de uma coleção mais ampla de amostras de EPEC e DAEC através do ensaio de PCR *multiplex* permitirá a confirmação de que o achado isolado de *aaiA* nesse teste deva ser considerado como um resultado negativo.

O ensaio desenvolvido detectou 39 EAEC típicas (100%) e 16 atípicas (84,2%). Cabe salientar que dentre as atípicas detectadas, 10 foram positivas apenas para os genes cromossômicos *aaiA* e *aaiG*. Desse modo, se fossem utilizados apenas os genes plasmidiais (*aggR* e *aatA*) essas amostras não seriam detectadas. Portanto, houve um aumento de 60% na detecção de EAEC atípica com a inserção desses marcadores cromossômicos.

O fato de ter havido um aumento na detecção de EAEC atípica na coleção estudada demonstra que a inserção dos genes cromossômicos (*aaiA* e *aaiG*) no ensaio de PCR *multiplex* para o diagnóstico de EAEC torna o teste mais abrangente, ou seja, amostras que anteriormente não seriam detectadas utilizando os genes *aggR* e/ou *aatA* têm maior probabilidade de serem reveladas com a utilização dos genes cromossômicos, demonstrando mais uma vez a eficiência da PCR *multiplex* proposta.

Nos laboratórios clínicos do nosso país a identificação dos patótipos de DEC na coprocultura é baseada na soroaglutinação de cepas de *E. coli* com antissoros polivalente que detectam os sorogrupos clássicos de EPEC, de EIEC e o sorogrupo O157 de EHEC (LEVY; VAZ, 2010). Essa técnica de diagnóstico além de não detectar EAEC, também exclui EPEC atípicas (não pertencentes aos sorogrupos clássicos de EPEC), DAEC, ETEC e outros sorogrupos de STEC (HERNANDES et al., 2009; NATARO; KAPER, 1998).

Na tentativa de ampliar esse esquema diagnóstico o Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan vem desenvolvendo um ensaio imunocromatográfico empregando anticorpos específicos para o diagnóstico de EPEC, ETEC e STEC (ROCHA, 2012). O patótipo EAEC não pôde ser incluído nesse diagnóstico devido à falta de um fator de virulência comum à maioria das cepas desse grupo.

A adição da PCR *multiplex* para EAEC ao teste imunocromatográfico permitiria a detecção dos quatro patótipos de DEC mais prevalentes em nosso meio (GUTH et al., 2010).

Segundo Mosammaparast et al. (2012) testes moleculares para a detecção de doenças infecciosas são cada vez mais comuns e devem ser executados no próprio laboratório clínico, ao invés de restritos a centros de referência. Embora essa técnica apresente limitações pela necessidade de um aparelho termociclador e de aparato para a eletroforese em gel de agarose, grande parte dos laboratórios clínicos de médio e grande porte já dispõe dessa tecnologia em nosso país.

A proposta de PCR *multiplex* para a detecção de EAEC típica e atípica representa uma possibilidade de melhora no diagnóstico de DEC em laboratórios clínicos. O teste proposto neste projeto mostrou uma alta sensibilidade e especificidade e dessa forma pode ser considerado como uma boa alternativa para o diagnóstico de EAEC tanto típica como atípica, a partir de colônias isoladas na coprocultura e já identificadas como *E. coli*.

Um avanço na proposta do ensaio de PCR *multiplex* para detecção de EAEC típica e atípica será a sua avaliação em colônias isoladas diretamente de meios de cultura seletivos (sem identificação bioquímica de *E. coli*) e também diretamente das fezes. Essas propostas terão continuidade por nosso grupo.

6 CONCLUSÃO

O teste de PCR *multiplex* desenvolvido apresentou alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de EAEC a partir de colônias isoladas de *E. coli* e permitiu um acréscimo na detecção de EAEC atípica.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, J. A.; ERICSSON, C. D.; JIANG, Z. D.; DUPONT, M. W.; PALLEGAR, S. R.; DUPONT, H. I. Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 1681-1683, 2002.
- AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1137-1144, 2004.
- ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 267, p. 145-150, 2007.
- ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5849-5853, 2004.
- ARAUJO, J. M.; TABARELLI, G. F.; ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C. M.; SCALETSKY, I. C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3396-3999, 2007.
- ASLANI, M. M.; ALIKHANI, M. Y.; ZAVARI, A.; YOUSEFI, R.; ZAMANI, A. R. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 15, p. 136-139, 2010.
- BANDO, S. Y.; ANDRADE, F. B.; GUTH, B. E. C.; ELIAS, W. P.; MOREIRA-FILHO, C. A. PESTANA DE CASTRO A. F. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 299, p. 22-30, 2009.
- BAUDRY, B.; SAVARINO, S. J.; VIAL, P.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 1249-1251, 1990.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 1539-1546, 1992.

*De acordo com:

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

BERGAN, J.; DYVE LINGELEM, A. B.; SIMM, R.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Shiga toxins. **Toxicon.**, v. 60, p. 1085-1107, 2012.

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

BHAN, M. K.; BHATNAGAR, S. Persistent diarrhea in infants and young children. **Indian Pediatr.**, v. 30, p. 147-151, 1993.

BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCH, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Characterisation of the enteroaggregative *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 11, p. 671-676, 2011.

BILGE, S. S.; CLAUSEN, C. R.; LAU, E.; MOSELEY, S. T. Molecular characterization of fimbrial adhesion, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4281-4289, 1989.

BISCHOFF, C.; LÜTHY, J.; ALTWEGG, M.; BAGGI F. Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR. **J. Microbiol. Methods**, v. 61, p. 355-341, 2005.

BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C. F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, p. 1969-1987, 2010.

BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO J. P. New adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 281-292, 2008.

BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D. A.; REDMAN, J. C.; PERSSON, S.; SIMON, J.; KOTLOFF, K.L.; LEVINE, M.M.; SOW, S.; TAMBOURA, B.; TOURE, A.; MALLE, D.; PANCHALINGAM, S.; KROGFELT, K.A.; NATARO, J.P. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J. Infect. Dis.**, v. 205, p. 431-444, 2012.

BOOP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A.; FIELDS, P. I. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2003. cap. 42, v. 1, p. 654-700.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; ZAREPOUR, M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. **Infect. Genet. Evol.**, v. 5, p. 79-83, 2005.

BUERIS, V.; SIRCILLI, M. C.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETI, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 545-552, 2004.

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

CHAUDHURI, R. R.; SEBAIHIA, M.; HOBMAN, J. L.; WEBBER, M. A.; Leyton, D. L.; GOLDBERG, M. D.; CUNNINGHAM, A. F.; SCOTT-TUCKER, A.; FERGUSON, P. R.; THOMAS, C. M.; FRANKEL, G.; TANG, C. M.; DUDLEY, E. G.; ROBERTS, I. S.; RASKO, D. A.; PALLEN, M. J.; PARKHILL, J.; NATARO, J. P.; THOMSON, N. R.; HENDERSON, I. R. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One**, v. 5, e8801, 2010.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut. Microbes**, v. 3, p. 71-87, 2012.

COBELJIĆ, M.; MILJKOVIĆ-SELIMOVIĆ, B.; PAUNOVIĆ-TODOSIJEVIĆ, D.; VELICKOVIĆ, Z.; LEPSANOVIĆ, Z.; ZEC, N.; SAVIĆ, D.; ILIĆ, R.; KONSTANTINOVIĆ, S.; JOVANOVIĆ, B.; KOSTIĆ, V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 11-16, 1996.

COHEN, M. B.; NATARO, J. P.; BERNSTEIN, D. I.; HAWKINS, J.; ROBERTS, N.; STAAT, M. A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J. Pediatr.**, v. 146, p. 54-61, 2005.

COOKSON, S. T.; NATARO, J. P. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.**, v. 21, p. 421-434, 1996.

CORDEIRO, F.; PEREIRA D. S. G.; ROCHA, M.; ASSENSI, M. D.; ELIAS, W. P.; CAMPOS, L. C. Evaluation of a multiplex PCR for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 828-829, 2008.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, v. 304, p. 242-248, 2004.

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **Lancet**, v. 337, p. 262-264, 1991.

CREPIN, V. F.; SHAW, R.; ABE, C. M.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 2881-2889, 2005.

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

CROWTHER, J. R. **The ELISA guidebook**. New Jersey: Humana Press, 2001. v. 149, cap. 8 p. 314-315.

CZECZULIN, J. R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4135-4145, 1997.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DUDLEY, E. G.; ABE, C.; CHIGO, J. M.; LAROOUR-LAMBERT, P.; HORMAZABAL, J. C.; NATARO, J. P. An Inc11 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.**, v. 74 p. 2102-2114, 2006a.

DUDLEY, E. G.; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MORIN, N. P.; NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 1267-1282, 2006b.

ELIAS, W. P.; SUZART, S.; TRABULSI, L. R.; NATARO, J. P.; GOMES, T. A. Distribution of *aggA* and *aafA* gene sequences among *Escherichia coli* isolates with genotypic or phenotypic characteristics, or both, of enteroaggregative *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 597-599, 1999.

ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA, S. K.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol. Infect.**, v. 129, p. 49-55, 2002.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, G.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, na autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3155-3163, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 66, p. 281-298, 2012.

FANG, G. D.; LIMA, A.; MARTINS, C. V.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based,

prospective, case-control study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, p. 137-144, 1995.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. **Cell. Microbiol.**, v. 10, p. 549-556, 2008.

FISCHER WALKER, C. L.; PERIN, J.; ARYEE, M. J.; BOSCHI-PINTO, C.; BLACK, R. E. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. **BMC Public. Health.**, v. 12, p. 220, 2012.

FOUHY, F.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C.; COTTER, P. D. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. **Gut. Microbes**, v. 3, p. 203-220, 2012.

FUJIOKA, M.; KASAI, K.; MIURA, T.; SATO, T.; OTOMO, Y. Rapid diagnostic method for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 62, p. 476-480, 2009.

FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The *shf* gene of *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Curr. Microbiol.**, v. 56, p. 474-480, 2008.

GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends Microbiol.** v. 4, p. 444-452, 1996.

GARCIA, P. G.; SILVA, V. L.; DINIZ, C. G. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. **J. Microbiol.**, v. 49, p. 46-52, 2011.

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

GIRÓN, J. A.; DONNENBERG, M. S.; MARTIN, W. C.; JARVIS, K. G.; KAPER, J. B. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 1037-1041, 1993.

GIRÓN, J. A.; JONES, T.; MILLÁN-VELASCO, F.; CASTRO-MUNOZ, E.; ZARATE, L.; FRY, J.; FRANKEL, G.; MOSELEY, S. L.; BAUDRY, B.; KAPER, J. B.; SCHOOLNIK, G. K.; RILEY, L. W. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 507-513, 1991.

GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; ABE, C. M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P. M.; RAMOS, S. R. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3609-3613, 1998.

GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M. H.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 204-221, 2007.

GUION, C. E.; OCHOA, T. J.; WALKER, C. M.; BARLETTA, F.; CLEARY, T. G. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.** v. 46, p. 1752-1757, 2008.

GUTH, B. E. C.; PICHETH, C. F.; GOMES, T. A. T. *Escherichia coli* situation in Brazil. In: TORRES, A. G. (Ed.). **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Oak Park: Bentham Science Publishers, 2010. cap. 11, p. 162-178. eISBN: 978-1-60805-192-2.

GUNZBURG, S. T.; CHANG, B. J.; ELLIOTT, S. J.; BURKE, V.; GRACEY, M. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. **J. Infect. Dis.**, v. 67, p. 755-8, 1993.

HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, p. 154-155, 2007.

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

HENDERSON, I. R.; CZECHULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A.T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, p. 137-149, 2009.

HERNANDES, R. T.; VIEIRA, M. A. M.; CARNEIRO, S. M.; SALVADOR, F. A.; GOMES, T. A. T. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 4214-4217, 2006.

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanisms. **Gut. Microbes.**, v. 1, p. 4-21, 2010.

HUANG, D. B.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. Association of virulence factor-positive and –negative enteroaggregative *Escherichia coli* and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 69, p. 506-508, 2003.

HUANG, D. B.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, p. 266-271, 2004.

HUANG, D. B.; NATARO, J. P.; DuPONT, H. L.; KAMAT, P. P.; MHATRE, A. D.; OKHUUSEN, P. C.; CHIANG T. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 556-563, 2006.

HUANG, D. B.; MOHAMED, J. A.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; OKAHUUSEN, P. C. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 1386-1392, 2007.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional por amostra de domicílios**. v. 31, p. 1-135, 2011.

ISIDEAN, S. D.; RIDDLE, M. S.; SAVARINO, S. J.; PORTER, C. K. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine**, v. 29, p. 6167-6178, 2011.

ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; EZAKI, T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2546-2550, 1997.

JENKINS, C.; CHART, H.; WILLSHAW, A.G.; CHEASTY, T.; SMITH, H.R. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 55, p.13-19, 2006a.

JENKINS, C.; TEMBO, M.; CHART, H.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G. A.; PHILLIPS, A. D.; SMITH, H. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1493-1497, 2006b.

JIANG, Z. D.; GREENBERG, D.; NATARO, J. P.; STEFFEN, R.; DUPONT, H. L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in intestinal travelers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 4185-4190, 2002.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 73, p. 750-774, 2009.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130-133, 1996.

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

KARMALI, M. A.; GANNON, V.; SARGEANT, J. M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Vet. Microbiol.**, v.140, p. 360-370, 2010.

KNUTTON, S. R.; SHAW, A. D.; PHILLIPS, H. R.; SMITH, G. A.; WILLSHAW, P.; WATSON, E. P. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 33 p. 32-40, 2001.

LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 256, p. 185-194, 2006.

LEVY, E. C.; VAZ, T. M. Enterobactérias. In: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Brasília, 2010. cap. 3, p. 35-58. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 jun. 2013.

LIMA, I. F.; BOISEN, N.; QUETZ, J. S.; HAVT, A.; DE CARVALHO, E. B.; SOARES, A. M.; LIMA, N. L.; MOTA, R. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 683-6, 2013a.

LIMA, I. F.; QUETZ, J. D. A. S.; GUERRANT, R. L.; NATARO, J. P.; HOUP, E. R.; LIMA, A. A.; HAVT, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* quantification in children stool samples using quantitative PCR. **APMIS.**, v. 121, p. 643-651, 2013b.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. J.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Pediatr. Suppl.**, v. 381, p. 37-44, 1992.

MAIRENA, E. C.; NEVES B. C.; TRABULSI L. R.; ELIAS, W. P. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 48, p. 412-418, 2004.

MARQUES, L. R.; ABE, C. M.; GRIFFIN, P. M.; GOMES, T. A. Association between alpha-hemolysin production and HeLa cell-detaching activity in fecal isolates of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33 p. 2707–2709, 1995.

MARTINEZ, M. B.; WHITTAM, T. S.; MCGRAW, E. A.; RODRIGUES, J.; TRABULSI, L. R. Clonal relationships among invasive and non-invasive strains of enteroinvasive *Escherichia coli* serogroups. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 172, p. 145-151, 1999.

MATHEWSON, J. J.; JIANG, Z. D.; ZUMLA, A.; CHINTU, C.; LUO, N.; CALAMARI, S. R.; GENTA, R. M.; STEEPHEN, A.; SCHWARTZ, P.; DUPONT, H. L. HEp-2 cell-

adherent *Escherichia coli* in patients with human immunodeficiency virus-associated diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 1636-1639, 1995.

McDANIEL, J. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MENEZES, C. A.; IMAMURA, S. Y.; TRABULSI, L. R.; FERNANDES-FILHO, A.; MARTINEZ, M. B.; GUTH, B. E. C.; GIRÃO, D. M.; PIAZZA, R. M. F. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin (LT-I) for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 875-880, 2006.

MIQDAY, M. S.; JIANG, Z. D.; NATARO, J. P.; DUPONT, H.L. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* with formalin-preserved HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3066-3067, 2002.

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

MONTEIRO, B. T.; CAMPOS, L. C.; SIRCILI P. M.; FRANZOLIN M. R.; BEVILACQUA, L. F.; NATARO, J. P.; ELIAS, W. P. The dispersin-encoding gene (*aap*) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 65, p. 81-84, 2009.

MONFRADINI, M. V. **Caracterização Genotípica e Fenotípica de Amostras de *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) e com Padrão *Chain-like adhesion* (CLA) de Crianças com e sem Diarreia.** 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas). Universidade Federal do Espírito Santo. UFES.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MORAIS, T. B.; GOMES, T. A.; SIGULEM, D. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. **Lancet**. v. 349 p. 1448-1449, 1997.

MORENO, A. C. R.; FERNANDES-FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; SANTOS-FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, p. 50-57, 2010.

MORIN, N.; SANTIAGO, A. E.; ERNST, R. K.; GUILLOT S. J.; NATARO, J. P. Characterization of the AggR Regulon in enteroaggregative *E. coli*. **Infect. Immun.**, v. 81, p. 122-132, 2012.

MOSAMMAPARAST, N.; MCADAM, A. J.; NOLTE, F. S. Molecular testing for infectious diseases should be done in the clinical microbiology laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, p. 1836-1840, 2012.

MÜLLER, D.; GREUNE, L.; HEUSIPP, G.; KARCH, H.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. **Appl Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 3380-3390, 2007.

MUNIESA, M.; HAMMERL, J. A.; HERTWIG, S.; APPEL, B.; BRÜSSOW, H. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a new challenge for microbiology. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 4065-4073, 2012.

NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 4-8, 2005.

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

NATARO, J. P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 465-468, 1995.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of enteroaggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4691-4699, 1994.

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

NATARO, J. P.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N.; LEVINE, M. M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 560-565, 1985.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, E.; PRADO, V.; VIAL, P. A.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 829-831, 1987.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Gut. Microbes**, v. 2, p. 13-24, 2011.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P.; FLORES, J.; OKHUYSEN, P. C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. (Ed.). **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Oak Park: Bentham Science Publishers, 2010. cap. 4, p. 48-64. eISBN: 978-1-60805-192-2.

NAVARRO-GARCÍA, F.; ESLAVA, C.; VILLASECA, J. M.; LÓPEZ-REVILLA, R.; CZECHULIN, J. R.; SRINIVAS, S.; NATARO, J. P.; CRAVIOTO, A. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66 p. 3149-3154, 1998.

NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 2, p. 1-7, 2012.

NGUYEN, T. V.; VAN, P. L.; HUY, C. L.; NGUYEN-GIA, K.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 755–760, 2005.

NISHI, J.; SHEIKH, J.; MIZUGUCHI, K.; LUISI, B.; BURLAND, V.; BOUTIN, A.; ROSE, D. J.; BLATTNER, F. R.; NATARO, J. P. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 45680-45689, 2003.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 478-483, 2011.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 852-856, 2008.

OKEKE, I. N. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 3, p. 817-842, 2009.

OKEKE, I. N.; OJO, O.; LAMOKANRA, A.; KAPER, J. B. Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4525-4230, 2003.

OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A.; STEINRÜCK, H.; KAPER, J. B. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 7–12, 2000.

OLIVEIRA, T. C. R.; LATORRE, M. R. D. O. Tendências da internação e da mortalidade infantil por diarreia: Brasil, 1995 a 2005. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, p. 102-111, 2010.

PANCHALINGAM, S.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, A.; MANDOMANDO, I.; OCHIENG, B.; OUNDO, J.; RAMAMURTHY, T.; TAMBOURA, B.; ZAIDI, A. K.; PETRI, W.; HOUP, E.; MURRAY, P.; PRADO, V.; VIDAL, R.; STEELE, D.; STROCKBINE, N.; SANSONETTI, P.; GLASS, R. I.; ROBINS-BROWNE, R. M.; TAUSCHEK, M.; SVENNERHOLM, A. M.; KOTLOFF, K.; LEVINE, M. M.; NATARO, J. P. Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, Suppl 4, S294-302, 2012.

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

PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S.; GIUGLIANO, L. G. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct

clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 366-374, 2007.

PETRI, W. A.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 1277-1290, 2008.

PIVA, I. C.; PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S. N.; VIEIRA, A. C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; GIUGLIANO, L. G. Virulence markers of enteroagregative *Escherichia coli* from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1827-1832, 2003.

POLITO, M. G.; KIRZTAJN, G. M. Microangiopatias trombóticas: púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urêmica. **J. Bras. Nefr.**, v. 32, p. 303-315, 2010.

PUKATZKI, S.; MA, A. T.; STURTEVANT, D.; KRASTINS, B.; SARRACINO, D.; NELSON, W. C.; HEIDELBERG, J. F.; MEKALANOS, J. J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103 p. 1528-1533, 2006.

QADRI, F.; SVENNERHOLM, A. M.; FARUQUE, A. S. G.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.

RASKO, D. A.; WEBSTER, D. R.; SAHL, J. W.; BASHIR, A.; BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; PAXINOS, E. E.; SEBRA, R.; CHIN, C. S.; ILIOPOULOS, D.; KLAMMER A.; PELUSO, P.; LEE, L.; KISLYUK, A. O.; BULLARD, J.; KASARSKIS, A.; WANG, S.; EID, J.; RANK, D.; REDMAN, J. C.; STEYERT, S. R.; FRIMODT-MØLLER, J.; STRUVE, C.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P.; SCHADT, E. E.; WALDOR, M. K. Origins of the *Escherichia coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, p. 709-717, 2011.

REGUA-MANGIA, A. H.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Infect.**, v. 48, p. 161-167, 2004.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JONHSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681-685, 1983.

ROBINS-BROWNE, R. M.; BORDUN, A. M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V. R.; RUSSEL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N. A.; BETTELHEIM, K. A.; FAIRLEY, C. K.; SINCLAIR, M. I.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1797-1805, 2004.

ROCHA, L. B. **Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**. 158 f. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

RODRIGUES, J.; ACOSTA, V. C.; CANDEIAS, J. M.; SOUZA, L. O.; FILHO, F. J. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1311-1318, 2002.

RODRIGUES, J.; SCALETISKY, I. C.; CAMPOS, L. C.; GOMES, T. A.; WHITTAM, T. S.; TRABULSI, L. R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2680-2686, 1996.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

RÜTTLER, M. E.; YANZÓN, C. S.; CUTTIÑO, M. J.; RENNA, N. F.; PIZARRO, M. A.; ORTIZ, A. M. Evaluation of multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocellular**, v. 30, p. 301-308, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; DILLINGHAM, R.; PINKERTON, R. C.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 142-150, 2007.

SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J. P.; SHEIKH, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K.; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 133-139, 2004.

SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; MOLINA, J.; CRAVIOTO, A.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M.; FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 1019–1022, 1996.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p. 3093-3097, 1993.

SAVARINO, S. J.; FOX, P.; DENG, Y.; NATARO, J. P. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 176 p. 4949-4957, 1994.

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

SCALETISKY, I. C. A.; FABBRICOTI, S. H.; SILVA, S. O.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 855-858, 2002.

SCALETISKY, I. C. A.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C. A.; CARVALHO, R. L.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

SCALETISKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-536, 1984.

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

SHEIKH, J.; DUDLEY, E. G.; SUI, B.; TAMBOURA, B.; SULEMAN, A.; NATARO, J. P. EilA, a HliA-like regulator in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 338-350, 2006.

SHEIKH, J.; CZECZULIN, J. R.; HARRINGTON, S.; HICKS, S.; HENDERTON, I. R.; LE BOUGUÉNEC, C.; GOUNON, P.; PHILLIPS, A.; NATARO, J. P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 1329-1337, 2002.

SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **Lancet**, v. 350, p. 814-815, 1997.

SOBEL, J.; GOMES, T. A.; RAMOS, R. T.; HOEKSTRA, M.; RODRIGUE, D.; RASSI, V.; GRIFFIN, P. M. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal illness in children aged 12-59 months in São Paulo, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38 p. 1545-1551, 2004.

SOUZA, T. B.; LOZER, D. M.; KITAGAWA, S. M.; SPANO, L. C.; SILVA, N. P.; SCALETISKY, I. C. Real-time multiplex PCR assay and melting curve analysis for identifying diarrheagenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, p. 1031-1033, 2013.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 622-647, 1992.

SPANO, L. C.; SADOVSKY, A. D. I.; SEGUI, P. N.; SAICK, K. E.; KITAGAWA, S. M. S.; PEREIRA, F. E. L.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 359-363, 2008.

TADDEI, C. R.; MORENO A. C. R.; FERNANDES-FILHO A.; MONTEMOR L. P. G.; MARTINEZ, M. B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 227, p. 249-253, 2003.

TANIUCHI, M.; WALTES, C. C.; GRATZ, J.; MARO, A.; KUMBURU, H.; SERICHANTALERGS, O.; SETHABUTR, O.; BODHIDATTA, L.; KIBIKI, G.; TONEY, D. M.; BERKELEY, L.; NATARO, J. P.; HOUP, E. R. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 73, p. 121-128, 2012.

TOMA, C.; LU, Y.; HIGA, N.; NAKASONE, N.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 2669-2671, 2003.

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

TURNER, S. M.; SCOTT-TUCKER, A.; COOPER, L. M.; HENDERSON, I. R. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, p. 10-20, 2006.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION.

Diarrhoea: why children are still dying and what can be done, 2009. Disponível em:

<http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241598415/en/index.html>. Acesso em: 15 nov. 2012.

VASCONCELLOS, F. M. **Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf.** 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VELARDE, J. J.; VARNEY, K. M.; INMAN, K. G.; FARFAN, M.; DUDDLEY, E.; FLETCHER, J.; WEBER, D. J.; NATARO, J. P. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, p. 1123-1135, 2007.

VIDAL, J. E.; CANIZÁLEZ-ROMÁN, A.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; NAVARRO-GARCIA, F. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Salud. Publica Mex.**, v. 49, p. 376-386, 2007.

VILA, J.; VARGAS, M.; HENDERSON, I. R.; GASCÓN, J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. **J. Infect. Dis.**, v.182, p. 1780-1783, 2000.

VILLASECA, J. M.; NAVARRO-GARCÍA, F.; MENDOZA-HERNÁNDES, G.; NATARO, J. P.; CARVIOTO, A.; ESLACA, C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 5920-5927, 2000.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Improving diarrhea estimates**. Child and adolescent health and development. Geneva, 2009.

YAMAMOTO, T.; KOYAMA, Y.; MATSUMOTO, M.; SONODA, E.; NAKAYAMA, S.; UCHIMURA, M.; PAVEENKITTIPORN, W.; TAMURA, K.; YOKOTA, T.; ECHEVERRIA, P. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 166, p. 1295-12310, 1992.

ZAMBONI, A.; FABRICOTTI S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. A. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1058-1063, 2004.