



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE
Escherichia coli DIARREIOGÊNICA ISOLADAS DE CRIANÇAS
NA CIDADE DE BOTUCATU, SÃO PAULO

REGIANE CHRYSOSTOMO BITENCORT DIAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez

BOTUCATU – SP
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE
Escherichia coli DIARREIOGÊNICA ISOLADAS DE CRIANÇAS
NA CIDADE DE BOTUCATU, SÃO PAULO

REGIANE CHRYSOSTOMO BITENCORT DIAS

RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez

**BOTUCATU – SP
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Dias, Regiane Chrysostomo Bitencort.

Prevalência e caracterização de amostras de *Escherichia coli* diarreiogênica isoladas de crianças na cidade de Botucatu, São Paulo / Regiane Chrysostomo Bitencort Dias. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

Capes: 21201013

1. Diarreia em crianças. 2. *Escherichia coli*. 3. Virulência (Microbiologia). 4. Epidemiologia - Pesquisa. 5. Botucatu (SP).

Palavras-chave: Epidemiologia; *Escherichia coli* diarreiogênica; Marcadores de virulência.

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada (área de concentração: Biologia de Parasitas e Microrganismos), no Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), com o auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP nº 2013/05170-1).

*“Grandes realizações são possíveis quando se dá importância
aos pequenos começos.”*

Lao-Tse

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Natalina e Manoel, por todo o esforço que fizeram para que eu tivesse a oportunidade de continuar os estudos. Pela confiança, apoio e incentivo, incansáveis, dedicados a mim. Pela educação, valores, fé e amor em mim solidificados.

*Ao Lauro, meu esposo, pelo amor e pela paciência.
Por sempre fazer tudo que está ao seu alcance. Por
apoiar e respeitar minhas decisões. Muito Obrigada
por estar sempre ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes, por me acolher em seu laboratório no início de sua Docência no Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB/UNESP, mas principalmente, por me orientar em todos os momentos desta dissertação de mestrado. Pelo seu conhecimento e pela convivência no desenvolvimento do mestrado, na presença no laboratório e na bancada, todos os dias, Você, é um exemplo a ser seguido. Muito Obrigada.

À todos os meus familiares e amigos, que diretamente me apoiaram, motivaram e incentivaram, agradeço de coração.

À Aydir Cecília, por me apresentar ao Prof^o Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandes, e me incentivar ao mundo acadêmico. Pelas caronas ao IBB/Unesp, pelas conversas e pelo carinho.

Às pessoas com quem divido as caronas: Ariane, Camila, Luís. É sempre um aprendizado conhecer e conviver com outras histórias de garra e perseverança, mesmo que por momentos corriqueiros da vida como o trajeto de Avaré a Botucatu.

Aos meus companheiros/amigos de laboratório Melissa Arruda Vieira, Bruna Cardoso, Renan Bardella, Noelle Amanda Betta Mariano. Pelo companheirismo, força, risadas, alegrias e momentos nem tão alegres assim. A todos vocês, mas à Bruna e ao Renan, principalmente, muito obrigada pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa, sem a ajuda de vocês eu não teria terminado a tempo. Muito Obrigada.

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia e Microbiologia do IBB/Unesp de Botucatu, Ivana, Larissa e Luís. Obrigada por serem, sempre, prestativos comigo.

Ao „Lula“ e à Dona Anita, por fazerem do departamento e, principalmente, da sala do meio de cultura um lugar mais alegre.

À Ana Cláudia Acerra, Secretária do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB/Unesp de Botucatu, por ajudar sempre que precisei.

Ao Prof^o Dr. Maurício Sforcin, pela atenção e pela ajuda, em todas as vezes que precisei.

Obrigada a todas as pessoas que, mesmo indiretamente, me incentivaram no decorrer do mestrado.

Ao Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), em especial, ao Dr. Alessandro Lia Mondelli, pelo auxílio na coleta de amostras e dados clínicos, e à Reonice Barriquello e Marcos Bronzato, pela colaboração na fase de coleta das amostras.

À Prof^a Terue Sadatsune, pela atenção e ajuda, em todos os momentos desta dissertação.

Ao Pesquisador Científico Luis Fernando dos Santos, do Instituto Adolfo Lutz, pela realização da sorologia e por estar sempre pronto a ajudar.

À Cefar, pela doação dos discos de antibióticos utilizados nessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2013/05170-1), pela concessão de auxílio à pesquisa e bolsa de estudo, viabilizando a realização deste projeto.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica	2
1.2. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	4
1.3. <i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga	5
1.4. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica	6
1.5. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora	8
1.6. <i>Escherichia coli</i> difusamente aderente	9
1.7. Epidemiologia de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica no Brasil	10
2. OBJETIVO	12
2.1. Objetivos específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Pacientes e Controles	13
3.2. Isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i> em amostras de fezes de Pacientes e Controles	13
3.3. Identificação de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica	14
3.4. Determinação do antígeno somático (O) e do antígeno flagelar (H) nos isolados de EPEC e STEC obtidos neste estudo	17
3.5. Teste de Adesão com células epiteliais HeLa	17
3.6. Teste de identificação da polimerização de actina	18
3.7. Teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas	19
3.8. Análise estatística	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Pacientes e Controles	20
4.2. Isolamento, identificação e caracterização dos Patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica (ECD) em amostras de fezes coletadas de crianças diarreicas (Pacientes) e não diarreicas (Controles)	22
4.3. Determinação dos antígenos somático (O) e flagelar (H) dos isolados de EPEC e STEC deste estudo	27

4.4. Teste de interação dos Patotipos EPEC, STEC e EAEC com células epiteliais (HeLa) cultivadas <i>in vitro</i>	28
4.5. Teste de identificação da polimerização de actina.....	35
4.6. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	38
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1.	Principais patotipos de <i>E. coli</i> diarreiogênica e marcadores de virulência frequentemente utilizados para identificação e classificação desses enteropatógenos	15
Tabela 2.	Sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR para a identificação de <i>E. coli</i> diarreiogênica	16
Tabela 3.	Faixa etária e sexo de crianças diarreicas incluídas neste estudo.	21
Tabela 4.	Prevalência dos patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica isolados nos grupos paciente e controle, na cidade de Botucatu.....	23
Tabela 5.	Ocorrência dos Patotipos de <i>E. coli</i> diarreiogênica nas diferentes faixas etárias das crianças diarreicas (Pacientes) e saudáveis (Controles) incluídas neste estudo.....	24
Tabela 6.	Relação dos genes de virulência identificados nos isolados de <i>E. coli</i> diarreiogênica obtidos neste estudo.....	26
Tabela 7.	Determinação do antígeno somático (O) e do antígeno flagelar (H) dos isolados de EPEC típica e atípica identificados neste estudo	28
Tabela 8.	Relação dos padrões de aderência encontrados nos patotipos EAEC típica e atípica, EPEC típica e atípica e STEC, nos grupos estudados (Pacientes e Controles)	34
Tabela 9.	Teste de FAS (<i>Fluorescence Actin Staining</i>) para identificação do acúmulo de actina característico da Lesão <i>attaching and effacing</i> (AE) nos isolados de EPEC e STEC (<i>eae</i> ⁺) produzindo distintos padrões de aderência em células HeLa, cultivadas <i>in vitro</i>	36
Tabela 10.	Relação de antibióticos e prevalência de resistência (%) entre os isolados de ECD identificados neste estudo.....	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representação esquemática da patogênese das infecções causadas por <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	3
Figura 2. Representação esquemática da patogênese das infecções causadas por <i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga (STEC)	6
Figura 3. Representação esquemática da patogênese das infecções por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	8
Figura 4. Incidência de casos de diarreia ocorridos entre crianças atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB – UNESP), entre os meses de Março de 2013 a Setembro de 2014	20
Figura 5. Principais sintomas clínicos observados entre as crianças diarreicas (pacientes) incluídas neste estudo	22
Figura 6. Microscopia óptica ilustrando os principais padrões de aderência detectados nos isolados de EPEC deste estudo	30
Figura 7. Microscopia óptica representando os padrões de aderência detectados nos dois isolados de STEC deste estudo	31
Figura 8. Microscopia óptica ilustrando os principais padrões de aderência detectados nos isolados de EAEC obtidos neste estudo	33
Figura 9. Microscopia de fluorescência representando o teste de identificação da polimerização de actina	37

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Aprovação desta pesquisa pelo Comitê de Ética	57
Anexo 2.	Questionário empregado para a pesquisa dos sintomas clínicos das crianças estudadas	58

RESUMO

Escherichia coli diarreiogênica (ECD) representa uma das principais causas da diarreia infantil. Com base em seus mecanismos de virulência, podemos classificá-la em seis patotipos distintos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC). O objetivo deste estudo foi investigar a prevalência de ECD, entre crianças diarreicas (Pacientes) e crianças saudáveis (Controles), menores de cinco anos de idade, na cidade de Botucatu/SP. Foram analisadas amostras de fezes de 200 crianças com diarreia, atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, entre os meses de Março de 2013 a Setembro de 2014, e 200 crianças saudáveis. Isolados de *E. coli* foram classificados nos distintos patotipos de ECD pela pesquisa de marcadores de virulência específicos através de PCR e, posteriormente, foram caracterizados quanto ao padrão de aderência em células HeLa e resistência à drogas antimicrobianas. Os isolados portadores do *locus of enterocyte effacement* (*eae*⁺) foram submetidos ao teste de FAS (*Fluorescence Actin Staining*), para avaliar a capacidade desses isolados em induzir a lesão *attaching and effacing* (AE). Ademais, os isolados de EPEC e STEC tiveram seu antígeno somático (O), e flagelar (H) determinados. ECD foi isolada de 18,0% das crianças diarreicas, e em 19,0% das crianças saudáveis, sendo que nenhum patotipo de ECD pode ser individualmente associado com a doença diarreica ($P > 0,05$). O patotipo EAEC foi o mais frequente, tendo sido detectado em igual proporção entre crianças diarreicas e saudáveis (10,0%). Dentre os isolados de EPEC, 16 provenientes das fezes de crianças com diarreia e 18 provenientes de crianças saudáveis, somente um foi capaz de aderir às células HeLa no padrão localizado (AL), sendo esse o único isolado classificado como EPEC típica. Todos os demais isolados de EPEC foram classificados como EPEC atípica (aEPEC), e detectados em 8 e 8,5% das crianças diarreicas e saudáveis, respectivamente. Os patotipos STEC e ETEC foram detectados em apenas uma criança de cada grupo estudado. Entre as aEPEC, o padrão de aderência localizada-like (ALL) foi detectado em 39,4% dos isolados. O teste de FAS, revelou que 96,9% dos isolados de aEPEC foram capazes de promover o acúmulo de actina abaixo do sítio de aderência bacteriana, característico da lesão AE, sendo o único isolado negativo para esse teste proveniente de uma criança do grupo controle. Os isolados de EPEC típica e STEC (*eae*⁺), também foram positivos no teste de FAS, e aderiram às células HeLa nos padrões AL e ALL, respectivamente. O padrão de aderência agregativo (AA) foi detectado em 70,0% dos isolados que albergavam marcadores

de virulência do patotipo EAEC (*aatA* e/ou *aggR*). Quanto aos sorotipos, 26,5% das EPEC pertencem aos sorogrupos clássicos de EPEC, sendo os sorotipos identificados: O26:H11, O55:H2, O55:H7, O55:H, O119:H2, O126:H19 e O142:H34. Os isolados de STEC provenientes de uma criança diarreica e de uma criança saudável foram classificados nos sorotipos O26:H11 e O119:H7, respectivamente. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos revelou que 44,6%, 29,7% e 2,7% dos isolados de ECD foram resistentes à Ampicilina, Cotrimoxazol e Gentamicina, respectivamente. Nossos dados revelam que ECD ainda representa um importante agente da doença diarreica entre crianças no município de Botucatu/SP, sendo EAEC e aEPEC os patotipos mais frequentes na população estudada, muito embora, outros estudos ainda se façam necessários para identificar quais os isolados realmente possam ser considerados patógenos verdadeiros, uma vez que todos os patotipos de ECD foram encontrados em proporções semelhantes entre crianças com diarreia e crianças saudáveis.

ABSTRACT

Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) comprises a major cause of child hood diarrhea. Based on their virulence mechanisms, DEC can be classified into six distinct pathotypes: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC). This study aims to investigate the prevalence of DEC among diarrheal children (patients) and healthy children (controls), up to five years of age in Botucatu/SP. We analyzed stool samples from 200 children with diarrhea attended at Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, between March/2013 and September/2014, and 200 healthy children. *E. coli* isolates were classified in different pathotypes by detection of virulence markers (by PCR) and then, characterized regarding its adherence pattern to HeLa cells and antimicrobial resistance drugs. Isolates carrying the locus of enterocyte effacement (*eaec*⁺) were submitted to FAS test (Fluorescence Actin Staining), to evaluate the ability of these isolates to induce attaching and effacing lesion (AE). In addition, EPEC and STEC isolates, had their somatic (O) and flagellar (H) antigens determined. DEC was isolated from 18.0% of diarrheal children, and 19.0% of healthy children, and none of the DEC pathotypes could be individually associated with the diarrheal disease ($P>0.05$). EAEC was the most frequent DEC pathotype, being detected in equal proportion between patients and controls (10.0%). Among the EPEC isolates, 16 from patients and 18 from controls, only one was able to produce the localized adherence (LA) pattern to HeLa cells, being this isolate the only typical EPEC (tEPEC) identified in this study. The remains EPEC isolates were classified as aEPEC (atypical EPEC), and detected in 8.0 and 8.5% of the patients and controls, respectively. STEC and ETEC were detected in only one child from each studied group. Among the aEPEC isolates, the localized adherence-like (LAL) was detected in 39.4% of the isolates. The FAS demonstrated that 96.9% of the aEPEC isolates were able to promote actin accumulation underneath adherent bacteria, being the only isolated negative in this assay obtained from a healthy child. The tEPEC and STEC (*eaec*⁺) isolates were also positive in the FAS test, and adhere to HeLa cells producing the LA and LAL pattern of adherence, respectively. The aggregative adherence pattern (AA) was detected in 70.0% of the isolates harboring virulence markers associated with the EAEC pathotype (*aatA* and/or *aggR*). Regarding the serotypes, 26.5% of EPEC isolates belong to classical EPEC serogroups, being the serotypes identified: O26:H11, O55:H2, O55:H7, O55:H⁻, O119:H2, O126:H19 and O142:H34. The STEC isolates obtained were classified into serotypes

O26:H11 (patient) and O119:H7 (control). The antimicrobial susceptibility test revealed that 44.6%, 29.7% and 2.7% of the DEC isolates were resistant to ampicillin, cotrimoxazole and gentamicin, respectively. Our data indicate that DEC remains an important agent of diarrheal disease among children living in Botucatu/SP, being EAEC and aEPEC the most frequent pathotypes in the population studied, although, additional studies may be necessary to identify truly pathogenic isolates, since all DEC pathotypes were found in similar proportions among children with and without diarrhea.

1. INTRODUÇÃO

A diarreia infecciosa é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de dois milhões de mortes a cada ano, particularmente, entre crianças abaixo de cinco anos de idade (BRYCE et al., 2005). A diarreia é causada por uma ampla variedade de patógenos, incluindo bactérias, vírus e protozoários. Os agentes infecciosos bacterianos mais frequentemente isolados em surtos de diarreia são *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholerae*. O modo de transmissão da maioria desses patógenos ocorre via fecal-oral, e a alta incidência de surtos de diarreia está diretamente associada a fatores sócio-ambientais, como a falta de saneamento básico, condições sanitárias precárias, além da contaminação da água e a higienização inadequada dos alimentos (WHO, 2009).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, *E. coli* é o agente infeccioso bacteriano mais encontrado nas formas endêmicas da diarreia infantil em todo o mundo (WHO, 2002). Compreende um grupo de micro-organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, os quais são caracterizados como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos e que colonizam o trato gastrointestinal do homem e de outras espécies de animais (DRASAR; HILL, 1974). Sendo uma das primeiras espécies bacterianas a colonizar o intestino do recém-nascido, a população de *E. coli* se mantém alta durante os seis primeiros meses de vida, mas cai cerca de dez vezes em crianças acima de seis meses de idade. A partir do primeiro ano de vida, a população de anaeróbios facultativos diminui enquanto a de anaeróbios obrigatórios se torna cada vez mais complexa (NOWROUZIAN et al., 2003).

E. coli e seus hospedeiros coexistem há milhares de anos em perfeita harmonia gerando benefícios mútuos. Entretanto, durante a evolução, alguns clones dessa espécie adquiriram uma série de fatores de virulência que lhes conferiram adaptação a novos nichos e a capacidade de causar um amplo espectro de doenças (KAPER et al., 2004). Cepas patogênicas de *E. coli* têm sido associadas com infecções urinárias, intestinais, meningites e até mesmo infecções sistêmicas (KAPER et al., 2004).

As amostras de *E. coli* associadas às infecções intestinais, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas e são classificadas em seis patotipos distintos, considerando os seus mecanismos de virulências específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos (O:H), os aspectos epidemiológicos e o tipo de interação com linhagens celulares cultivadas *in vitro* (NATARO; KAPER, 1998). Os patotipos de *E. coli* diarreiogênicas são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.*

coli enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* que adere difusamente às células epiteliais (DAEC). Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, torna-se evidente que algumas categorias incluem micro-organismos bastante complexos. Recentemente, as EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as EHEC passaram a constituir um subgrupo do patotipo denominado STEC que compreende amostras de *E. coli* que produzem a toxina de Shiga (Stx) (KAPER et al., 2004).

A seguir encontram-se apresentados os principais patotipos de *Escherichia coli* diarreioagênica.

1.1. *Escherichia coli* enteropatogênica

O termo “*E. coli* enteropatogênica – EPEC” foi criado por Neter e colaboradores (1955) para designar determinados sorogrupos de *E. coli* associados a casos de diarreia na Inglaterra, distinguindo-os assim dos sorogrupos de *E. coli* encontrados em indivíduos normais ou pacientes com processo de infecção extra-intestinal. O principal mecanismo de patogenicidade de EPEC compreende a produção de uma lesão histopatológica, em humanos e animais infectados, que é denominada lesão *attaching and effacing* (lesão AE). Nessa lesão, observa-se a destruição das microvilosidades e a aderência íntima da bactéria à membrana do enterócito, apoiada sobre uma estrutura semelhante a um pedestal, cuja base é rica em actina e outros elementos do citoesqueleto (MOON et al., 1983; KNUTTON et al., 1989). A formação da lesão AE depende da expressão de vários genes cromossômicos, agrupados na ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*) (MCDANIEL et al., 1995).

Atualmente, as EPEC têm sido divididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC) tendo por base a presença de pEAF (EPEC *adherence factor*), com expressão do operon *bfp*, nas tEPEC e ausência deste nas aEPEC (KAPER, 1996; TRABULSI et al., 2002; HERNANDES et al., 2009). Em ensaios de aderência em células HeLa ou Hep-2 cultivadas *in vitro*, as tEPEC produzem o padrão de adesão localizada (AL), que é mediado pela produção da fimbria BFP. Nesse padrão, ocorre formação de microcolônias compactas, em uma ou mais áreas da superfície de células eucarióticas *in vitro*, após um período de infecção de 3 horas (SCALETSKY et al., 1984; DONNENBERG et al., 1992). A maioria das amostras de aEPEC produz um padrão de aderência com microcolônias mais frouxas (adesão semelhante à localizada ou *AL-like*), que são visualizadas somente em períodos de ensaios mais prolongados (6 horas) (RODRIGUES et al., 1996). Tanto tEPEC como aEPEC não produzem

as enterotoxinas LT e/ou ST, como ocorre com as amostras de ETEC, ou toxinas semelhantes à Shiga, propriedade dos isolados de STEC (KAPER, 1996; TRABULSI et al., 2002). A figura 1 demonstra a patogênese de EPEC, que se inicia pela adesão aos enterócitos, injeção de proteínas efetoras na célula epitelial através do sistema de secreção do tipo 3, e a ligação tir-intimina ativando a polimerização de actina com formação de uma lesão característica, a lesão AE.

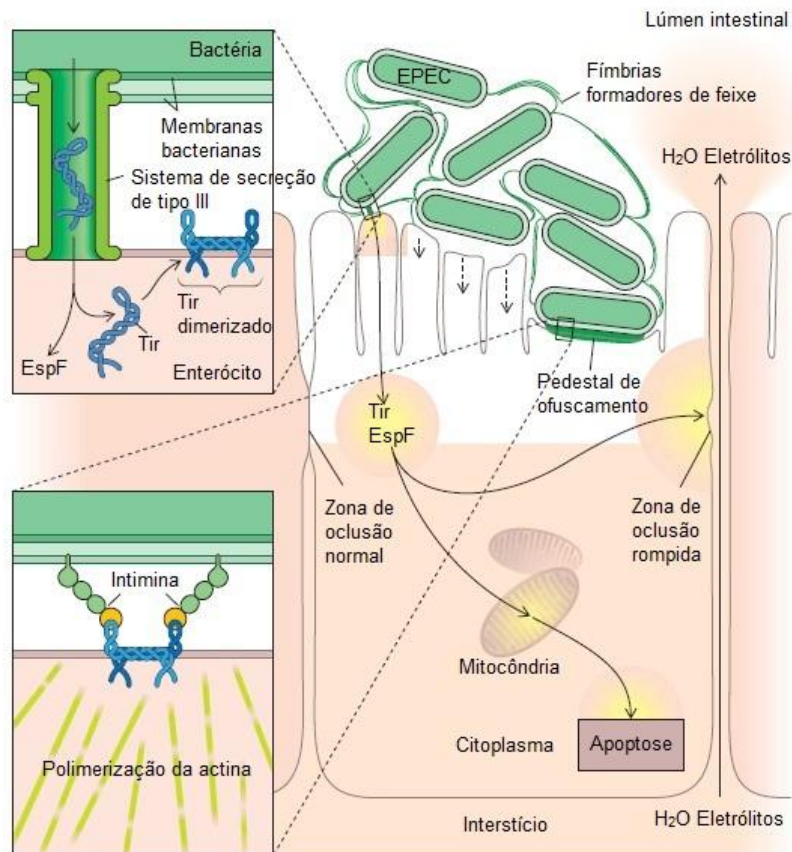


Figura 1. Representação esquemática da patogênese das infecções causadas por *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), demonstrando a adesão da bactéria ao epitélio do hospedeiro, com a injeção de proteínas efetoras na célula epitelial através do sistema de secreção do tipo 3, onde ocorre a ligação tir-intimina que ativa a polimerização de actina, levando à formação de pedestais característicos da lesão AE (extraído de DONNENBERG, 2011).

1.2. *Escherichia coli* enteroagregativa

EAEC é definida como o patotipo de *E. coli* que adere às células epiteliais (HeLa ou Hep-2) cultivadas *in vitro* no padrão denominado agregativo (AA) e que não secreta as enterotoxinas ST e LT elaboradas por ETEC (NATARO et al., 1987). O padrão AA foi estabelecido para definir a adesão em células Hep-2 de amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico envolvendo crianças com diarreia no Chile (NATARO et al., 1987).

Embora EAEC tenha sido inicialmente descrita como causa de diarreia aguda (NATARO et al., 1987), sua associação epidemiológica com essa patologia é ainda bastante controversa (GOMES et al., 1989; ZAMBONI et al., 2004; NATARO et al., 2006; BUERIS et al., 2007; SPANO et al., 2008). Por outro lado em países em desenvolvimento, EAEC tem sido fortemente associada à diarreia persistente, ou seja, com duração igual ou superior a 14 dias (CRAVIOTO et al., 1991; LIMA et al., 1992; FANG et al., 1995).

A patogênese compreende a colonização da mucosa intestinal seguida pela secreção de enterotoxinas e citotoxinas, resultando em uma diarreia secretória assim como a lesão da mucosa (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998). Vários potenciais fatores de virulência já foram descritos em EAEC, entretanto, a patogênese da diarreia causada por esse patotipo ainda não está totalmente esclarecida (HARRINGTON et al., 2006).

EAEC alberga um plasmídeo de virulência designado pAA. Alguns genes codificados no pAA são as fímbrias de aderência agregativa (AAF-I, II, III e IV) (CZECZULIN et al., 1997), e o ativador transcricional *aggR* (NATARO et al., 1994).

O ativador transcricional *aggR*, regulador de genes de virulência, é, atualmente, empregado para diferenciar o patotipo EAEC em típica e atípica, baseado na presença ou ausência deste gene, respectivamente (HARRINGTON et al., 2006). Segundo Morin et al. (2013), o fato de *aggR* ser regulador de genes de virulência sugere que isolados de EAEC típicas sejam cepas com alto potencial de causar a doença diarreica, já que elas albergariam vários genes de virulência. Embora, o potencial de EAEC atípica de causar diarreia não possa ser amenizado ou excluído (GIOPPO et al., 2000).

1.3. *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga

Isolados de STEC são considerados como patógenos em humanos desde 1982, quando na investigação de dois surtos de colite hemorrágica houve uma associação de um sorotipo de *E. coli* identificado como O157:H7 (RILEY et al., 1983).

STEC são patógenos importantes em todo o mundo, podendo causar desde diarreia leve até doenças graves, como a colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (SHU). Essas bactérias produzem uma potente toxina (toxina Shiga ou Stx) responsável pela diarreia sangüinolenta e o desenvolvimento da SHU (KAPER et al., 2004).

O gado e outros ruminantes são o reservatório natural de STEC, podendo o homem ser infectado através do consumo de alimentos contaminados com as fezes desses animais (KAPER et al., 2004).

A maioria dos casos de doença diarreica no mundo causada por STEC, está associada ao sorotipo O157:H7, mas outros sorogrupos como O26, O45, O103, O111, O113, O121 e O145 também têm sido reportados em associação com infecções do trato gastrointestinal em humanos (CAPRIOLI et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2010).

EHEC compreende uma subcategoria de STEC que além da toxina Stx possui uma ilha de patogenicidade (Região LEE). A região LEE é codificada por um sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3) e alberga o gene *eae* que codifica a adesina intimina, tornando-as capazes de estabelecer uma lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada de lesão *attaching and effacing* (lesão AE) (KAPER et al., 2004).

As toxinas Shiga, Stx1 e Stx2, são classificadas primariamente por suas propriedades imunológicas, e são codificadas pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente. De acordo com Paton e Paton (1998b), Stx1 é considerada praticamente idêntica a Stx produzida pela *Shigella dysenteriae* do tipo 1, sendo a diferença entre as duas toxinas de apenas um aminoácido na subunidade A. Isolados de STEC produtores de Stx2 são normalmente associados a doenças severas como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), muito mais frequentemente do que isolados de STEC que produzem somente Stx1 ou Stx1 associada a Stx2 (SIEGLER et al., 2003). A toxina Stx2 apresenta aproximadamente 56% de similaridade, na seqüência de aminoácidos, com a toxina Stx1 (PATON; PATON, 1998b). A figura 2 ilustra a patogênese de STEC, representando a translocação da toxina Shiga para a circulação sanguínea, ativando a cascata de coagulação, levando à formação de microtrombos e outras manifestações comuns da Síndrome Hemolítica Urêmica.

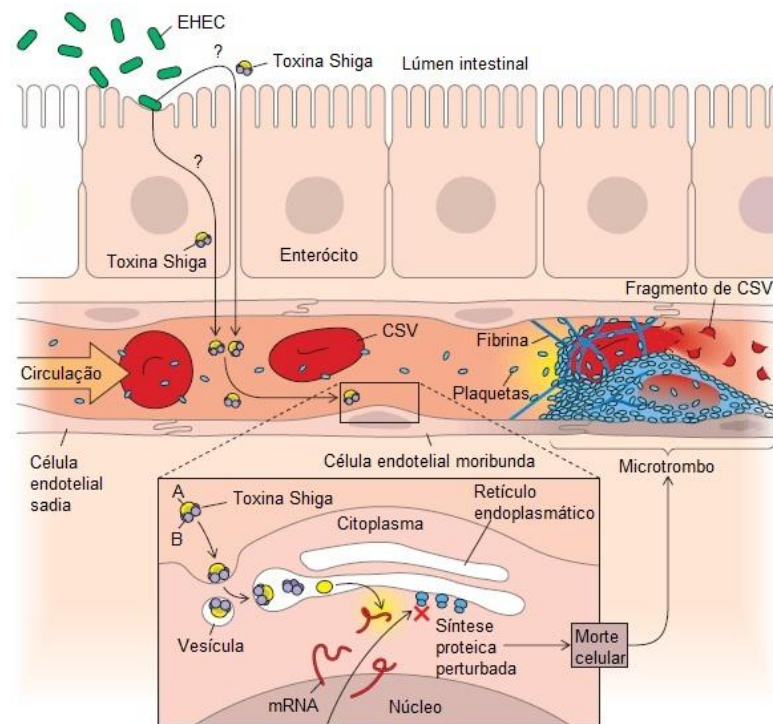


Figura 2. Representação esquemática da patogênese das infecções causadas por *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC). A toxina Shiga é translocada para a circulação sanguínea ativando a cascata de coagulação, que ocasiona a formação de microtrombos, com potencial para causar necrose isquêmica distal e rompimento de hemácias – características da Síndrome Hemolítica Urêmica (extraído de DONNENBERG, 2011).

1.4. *Escherichia coli* enterotoxigênica

O patótipo ETEC é considerado um patógeno importante na doença diarreica aguda em crianças menores de cinco anos de idade que vivem em países em desenvolvimento. O patótipo ETEC é considerado também o principal agente etiológico da “diarreia dos viajantes”, sendo responsável por causar diarreia tanto em visitantes de países desenvolvidos, como em visitantes de áreas endêmicas (QADRI et al., 2005). Os isolados de ETEC produzem toxinas que se diferenciam quanto à sua tolerância à temperatura, estrutura, mecanismo de ação e imunogenicidade, sendo essas toxinas classificadas em: termo-lábeis (LT) e termoestáveis (ST) (KAPER, 1998). Sendo assim, isolados de ETEC podem produzir somente LT ou LT e ST concomitantemente (KAPER, 1998).

De acordo com Fleckenstein e colaboradores (2010), as infecções provocadas por ETEC estão associadas com diarreia aquosa e os sintomas clínicos se aproximam dos

sintomas da cólera, vômito, dor de cabeça e náuseas, e, em alguns casos, a diarreia pode durar uma semana ou mais.

ETEC pode colonizar o intestino delgado através de diferentes fatores de colonização (CFS) que são capazes de se ligar aos receptores das células epiteliais no intestino. Na década de 90, outra nomenclatura começou a ser usada, denominando os fatores de colonização de antígeno de superfície de coli (CS), onde os mais encontrados em isolados de ETEC obtidos de indivíduos com diarreias incluem: CFA/1, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS14, CS17 E CS21 (GAASTRA, 1996; QADRI, 2005; CROXEN et al., 2013).

A toxina termoestável (ST) é classificada em dois grupos de acordo com suas propriedades química e biológica: STa (ou ST-I) e STb (ou ST-II). A toxina ST-I apresenta duas variantes genéticas: ST_h (ST-I_b), encontrado em isolados de ETEC patogênicos para o homem, e ST_p (ST-I_a), encontrado em isolados de ETEC patogênicos para suínos (FLECKENSTEIN, 2010). Na patogênese de ETEC, são relatadas alterações hidrossalínicas envolvendo a toxina ST de ETEC. A toxina ST liga-se ao domínio extracelular da guanilato ciclase tipo C (GC), na superfície das microvilosidades do epitélio intestinal, promovendo o aumento dos níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) intracelular. O GMPc, que é uma molécula sinalizadora de eventos intracelulares, reduz a absorção de sódio (Na⁺) nas células das vilosidades, e aumentam a secreção de cloro (Cl⁻) nas células das criptas, resultando em diarreia aquosa (PAWLOWSKI, 2009; FLECKENSTEIN, 2010).

A toxina LT, similar em estrutura e função com a enterotoxina de *Vibrio cholerae*, tem a capacidade de se ligar ao receptor epitelial gangliosídico GM1, que ativa a adenilato ciclase, produzindo aumento nos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Essa produção contínua de AMPc determina o aumento da secreção de Cl⁻ e diminuição da absorção de Na⁺. Esse desequilíbrio hidrossalínico na célula leva ao acúmulo de água no lúmen intestinal e conseqüentemente provoca a diarreia. A toxina LT de ETEC é classificada em LT-I, que está presente em isolados de ETEC patogênicos para o homem e alguns animais, e LT-II, que é encontrada principalmente em isolados ETEC patogênciso para animais (FLECKENSTEIN, 2010). A Figura 3 representa o processo de patogênese do patotipo ETEC, enfatizando, a adesão da bactéria às células epiteliais (através dos fatores de colonização) e secreção das toxinas LT e/ou ST.

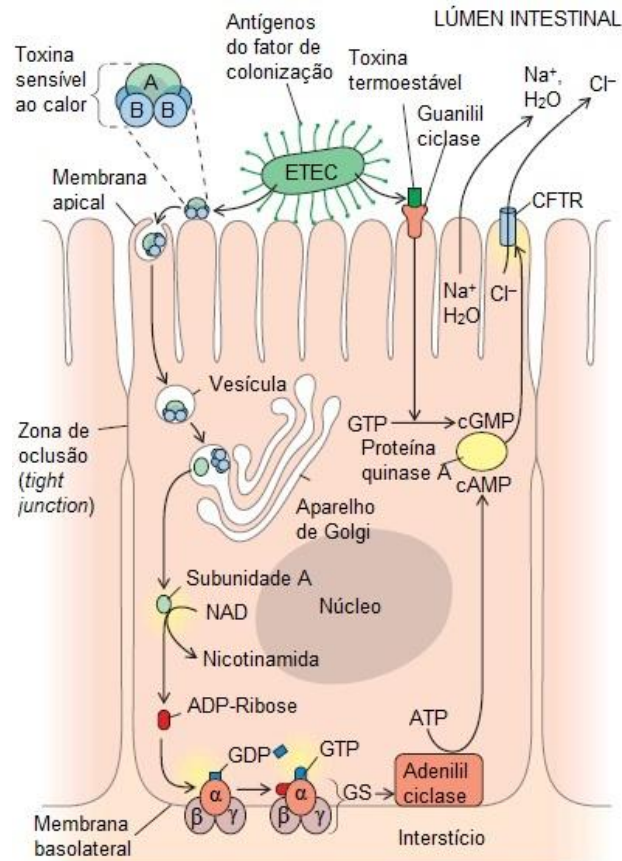


Figura 3. Representação esquemática da patogênese das infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) demonstrando o início da adesão da bactéria às células epiteliais através dos fatores de colonização, secreção das toxinas LT e/ou ST. Responsáveis por gerar alterações hidrossalínicas, as toxinas de ETEC, ocasionam o aumento da secreção de cloreto e diminuição da absorção de sódio no lúmen intestinal, resultando em diarreia. Cl⁻ = cloreto. GDP = difosfato de guanosina. GTP = trifosfato de guanosina. NAD = nicotinamida-adenina dinucleotídeo (extraído de DONNENBERG, 2011).

1.5. *Escherichia coli* enteroinvasora

Amostras de EIEC podem causar diarreia aquosa, colite inflamatória e, ocasionalmente disenteria em humanos, que se manifesta com sangue, muco e leucócitos nas fezes, cólicas abdominais severas e febre (NATARO; KAPER, 1998). As EIEC apresentam características bioquímicas, genéticas e patogênicas semelhantes aos isolados de *Shigella* spp. (LAN et al., 2004; PARSOT et al., 2005). Quanto às características bioquímicas, 80% ou mais dos isolados de *E. coli* são móveis, e descarboxilam a lisina (LDC), características bioquímicas que raramente podem ser observadas entre os isolados de EIEC e *Shigella* spp. (VAN DEN BELD et al., 2012). Entretanto, diferentemente da *Shigella dysenteriae* 1, a EIEC

não possui a toxina Shiga, motivo este que justifica a ausência da Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) nas infecções provocadas por EIEC (LAN et al, 2004).

O diagnóstico de EIEC baseia-se na detecção da capacidade invasora através do teste de ceratoconjuntivite em cobaia ou em cultura de células epiteliais, ou ainda pode ser realizada pela pesquisa de genes de virulência associados com o processo de invasão (NATARO; KAPER, 1998).

O principal mecanismo de patogenicidade de EIEC baseia-se na invasão da mucosa intestinal, lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimentação no citoplasma e passagem para as células adjacentes (NATARO; KAPER, 1998). Entretanto, para que tal mecanismo possa ocorrer, é necessário a expressão de vários genes de virulência, que ativados, consideravelmente em resposta a sinais do microambiente, são codificados por um plasmídeo de invasão denominado de pINV, também presente em *Shigella* (HARRIS et al., 1982; VAN DEN BELD et al., 2012). Ainda, segundo um estudo realizado por van den Beld e colaboradores (2012), especula-se que essa estreita semelhança entre *Shigella* e EIEC se deve à evolução a partir de um mesmo ancestral.

O SST3 de EIEC secreta múltiplas proteínas que são codificadas nos *loci ipa* (*invasion associated plasmid*) e medeiam tanto a sinalização na célula epitelial quanto ao rearranjo do citoesqueleto, captação celular e lise de vacúolo endocítico. Sistema, esse, essencial para o processo de invasão, embora, outros fatores de virulência, tanto plasmidial quanto cromossomal já tenham sido associados ao processo de patogenicidade desse patotipo de ECD (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Na invasão ao epitélio intestinal os genes *ipaBCD* e *mixAB* são expressos, e encontram-se localizados na ilha *ipa-mix-spa* no plasmídeo de invasão. Sendo assim, de acordo com Hale (1991), na ausência ou perda dessa ilha, pode-se considerar que a cepa se torne não patogênica. O gene *ipaH*, que está localizado no pINV, é encontrado em *Shigella* e EIEC (HALE, 1991), e pode ser utilizado como uma importante ferramenta para separá-las de outros isolados de *E. coli*, assim como o teste de motilidade, os testes bioquímicos (fermentação de salicina, hidrólise da esculina, formação de gás a partir da fermentação da D-glicose e a produção de indol) e sorologia podem ser utilizados para diferenciá-los (VAN DEN BELD et al., 2012).

1.6. *Escherichia coli* difusamente aderente

Isolados de DAEC são assim denominados devido ao padrão de adesão que apresentam quando colocados em contato com células epiteliais (HeLa ou Hep-2) cultivadas

in vitro (SCALETSKY et al., 1984). As bactérias aderem-se de forma difusa sobre a superfície celular. Até o momento, somente duas estruturas adesivas foram identificadas nesse patotipo de *E. coli* diarreiogênicas: a adesina fimbrial denominada F1845, e a proteína autotransportadora AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence*) (BILGE et al., 1989; BENZ; SCHMIDT, 1989).

Amostras de DAEC são capazes de produzir a toxina autotransportadora Sat, responsável por induzir o acúmulo de fluidos intestinais (TADDEI et al., 2005). A associação de DAEC com a doença diarreica é um assunto bastante controverso. No Brasil, a associação entre esse patotipo como agente de gastroenterite aguda foi demonstrada, porém somente em crianças com idade inferior a 12 meses (SCALETSKY et al., 2002; SPANO et al., 2008).

1.7. Epidemiologia de *Escherichia coli* diarreiogênica no Brasil

No Brasil, estudos indicam que nas últimas décadas houve uma diminuição da ocorrência da diarreia e da mortalidade pela doença diarreica, levando-se em consideração a melhora na condição social, econômica e de saúde (MELLI, 2009).

A partir dos anos 90, estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes regiões geográficas do Brasil, sobre a etiologia da doença diarreica, têm demonstrado que isolados de aEPEC e EAEC estão entre os patotipos mais frequentemente isolados (FRANZOLIN et al., 2005; ARAÚJO et al., 2007; ORLANDI et al., 2006; BUERIS et al., 2007; SPANO et al., 2008). Estudos anteriores, no final dos anos 90, conduzidos na cidade de Botucatu, já apontavam uma alta prevalência de EAEC entre crianças diarreicas no nosso município (RODRIGUES et al., 2002). No entanto, amostras de EAEC e aEPEC têm sido isoladas em igual frequência de crianças com diarreia (grupo paciente), bem como de crianças não diarreicas (grupo controle) dificultando assim a associação desses patotipos de *E. coli* diarreiogênicas como agente de infecções do trato gastrointestinal (GOMES et al., 1989; BUERIS et al., 2007; SPANO et al., 2008). Devido à extensão da região brasileira, é importante considerar as mudanças na sazonalidade e saneamento básico, assim, estudos revelam que as regiões onde há mais casos de diarreia, com respectivos aumentos em internações hospitalares e óbitos, são as regiões Norte e Nordeste (BÜHLER et al., 2014).

EPEC compreendeu o primerio grupo de *E. coli* a ser associado com a doença diarreica. Em 1987, a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization) convencionou classificar como EPEC os isolados de *E. coli* pertencentes aos sorogrupos:

O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WHO, 1987), conhecidos atualmente como sorogrupos clássicos de EPEC. Na década de 80, tEPEC (detectada bom base na determinação do antígeno somático O), representou um importante agente da doença diarreica em crianças, sendo responsável por aproximadamente 30% dos casos (GOMES et al., 1991), sendo os sorogrupos O55, O111 e O119 os mais prevalentes.

Estudos mostram que, hoje, além dos sorotipos clássicos de EPEC também são encontrados outros sorotipos, denominados não-clássicos (VIEIRA et al., 2001; ARAÚJO et al., 2007; MORENO et al., 2008; HERNANDES et al., 2009). Sendo assim, os métodos moleculares têm se mostrado mais eficazes na pesquisa e classificação das *Escherichia coli* diarreio gênicas (NATARO; KAPER, 1998; KAPER et al., 2004; CROXEN et al., 2013). Considerando-se as aEPEC, estudos realizados em Porto Velho (RO) e na cidade de São Paulo (SP) foram capazes de demonstrar uma clara associação entre esses isolados e a doença diarreica em crianças de até cinco anos de idade (ORLANDI et al., 2006; ARAUJO et al., 2007), enquanto em estudos realizados em outras cidades do Brasil como Salvador (BA), Vitória (ES) e Teresina (PI) tal associação não foi observada (BUERIS et al., 2007; SPANO et al., 2008; NUNES et al., 2012).

A dificuldade em associar aEPEC e também os isolados de EAEC com a doença diarreica pode ser atribuída ao caráter heterogêneo desses grupos (VIEIRA et al., 2001; GOMES et al., 2004; ZAMBONI et al., 2004; HERNANDES et al., 2009; TENNANT et al., 2009). Estudos de caracterização fenotípica e molecular de amostras de aEPEC têm demonstrado claramente que sub-populações deste patotipo podem ser mais frequentemente isolados de crianças com diarreia do que em indivíduos saudáveis (SCALETISKY et al., 2009; VIEIRA et al., 2010; GOMES et al., 2011). O papel de aEPEC e EAEC como um importante agente causador de infecções do trato gastrointestinal pode ser reforçada pelo envolvimento dessa bactéria em surtos de diarreia aguda, acometendo não somente crianças, como também indivíduos adultos (COBELJÍC et al., 1996; TRABULSI et al., 2002; HERNANDES et al., 2009, HAO et al., 2012).

STEC e ETEC são os patotipos de ECD menos frequentemente detectados em estudos enfocando a etiologia da doença diarreica no Brasil (FRANZOLIN et al., 2005; BUERIS et al., 2007). Dados muito semelhantes podem ser observados quando analisamos o papel da EIEC neste mesmo cenário (FRANZOLIN et al., 2005).

2. OBJETIVO

O principal objetivo deste estudo compreendeu investigar a prevalência dos diferentes patotipos de *E. coli* diarreio gênica entre crianças até 5 anos de idade atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, bem como caracterizar os isolados de *E. coli* diarreio gênica, em especial as amostras de EPEC atípica considerada atualmente, um patotipo emergente tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento.

2.1. Objetivos específicos

1. Avaliar a prevalência dos diferentes patotipos de *E. coli* diarreio gênica entre crianças até 5 anos na cidade de Botucatu, SP.
2. Determinar a associação entre os diferentes patotipos de *E. coli* diarreio gênica e a doença diarreica infantil através de uma análise caso-controle.
3. Avaliar as amostras de *E. coli* diarreio gênica quanto à capacidade de aderir às células cultivadas *in vitro*, bem como determinar o padrão de aderência desses isolados.
4. Avaliar os isolados portadores da região LEE quanto à capacidade de induzir a lesão *attaching and effacing*.
5. Caracterizar os isolados de *E. coli* diarreio gênica quanto a susceptibilidade a diferentes antimicrobianos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes e Controles

Este projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em reunião do dia 01 de Outubro de 2012 (Protocolo CEP 4347-2012) (Anexo 1).

O cálculo do número amostral analisado neste estudo foi determinado com o auxílio da Profª Dra. Lídia Raquel de Carvalho, do Departamento de Bioestatística, do Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu. A fórmula utilizada para este cálculo foi: $N = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \{ \pi_1 (1-\pi_1) + \pi_2 (1-\pi_2) \} / \delta^2$. Onde, na presente fórmula, $(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2$ foram obtidos através da distribuição normal e π_1 e π_2 foram as proporções obtidas através de estudos da literatura (ORLANDI et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007). Esta determinação teve como parâmetro a diferença na prevalência de *Escherichia coli* diarreiogênica (ECD) entre os grupos estudados de 8,6%, com poder do teste de 80% e 5% de nível de significância, tendo sido determinado em aproximadamente 200 indivíduos por grupo.

Foram incluídas neste estudo amostras coletadas de Março de 2013 a Setembro de 2014, de todas as crianças com diarreia que procuraram atendimento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, até atingir o número determinado (Pacientes). Com a mesma faixa etária, foram coletadas amostras de 200 crianças que não apresentaram diarreia (Controles), e que após entrevista, eram ausentes distúrbios gastrointestinais e antibioticoterapia por um período igual ou superior a 30 dias da data de coleta. O questionário utilizado para as entrevistas está localizado no Anexo 2.

3.2. Isolamento e identificação de *Escherichia coli* em amostras de fezes de Pacientes e Controles

Aproximadamente 2 gramas de fezes (o equivalente a 1 colher de sobremesa) foram coletados de crianças diarreicas em frascos contendo glicerina tamponada, logo no início do quadro clínico (geralmente no período entre 3 a 5 dias) e antes do início da antibioticoterapia. As amostras de fezes coletadas foram armazenadas sob refrigeração (de 2 a 8°C) por um período máximo de 24 horas e encaminhadas ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu.

Uma alçada das fezes foi semeada em ágar MacConkey, apropriado para o isolamento de *E. coli*. Após a incubação dos cultivos, por aproximadamente 18 horas a 37°C, foram selecionadas 7 colônias fermentadoras de lactose e 3 colônias não fermentadoras. Todas as colônias selecionadas foram submetidas a testes de identificação bioquímica através do cultivo nos meios de cultura EPM (Escola Paulista de Medicina), MILi (motilidade, indol e lisina) e Citrato de Simmons (TOLEDO et al., 1982a; TOLEDO et al., 1982b). O meio EPM foi empregado para a realização das seguintes provas bioquímicas: produção de gás a partir da fermentação da glicose, produção de H₂S, hidrólise da uréia e produção da enzima L-triptofano desaminase (LTD), enquanto o meio MILi, para a realização das provas de motilidade, produção de indol e produção da enzima lisina descarboxilase (LDC). O meio Citrato de Simmons foi utilizado para verificar a capacidade da bactéria isolada em obter energia utilizando o citrato, como única fonte de carbono. Esse conjunto de meios fornece oito reações bioquímicas, que, juntamente com o resultado da utilização da lactose nas placas de isolamento primário, permitem a identificação da maioria das enterobactérias isoladas a partir de amostras clínicas.

Fezes de crianças não diarreicas incluídas no grupo controle, obtidas após evacuação espontânea, foram igualmente processadas para o isolamento e identificação de *E. coli*.

3.3. Identificação de *Escherichia coli* diarreiogênica

Amostras identificadas bioquimicamente como *E. coli* foram investigadas quanto a presença de genes de virulência associados aos diferentes patótipos de *E. coli* diarreiogênica através da reação em cadeia da polimerase (PCR), e classificadas conforme esquema descrito na tabela 1.

Tabela 1. Principais patotipos de *E. coli* diarreioagênica e marcadores de virulência frequentemente utilizados para identificação e classificação desses enteropatógenos.

Patotipo de <i>E. coli</i> diarreioagênica	Marcadores de virulência
<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	Região LEE (<i>eae</i>), Plasmídeo EAF (<i>bfpA/bfpB</i>) e ausência de genes <i>stx</i> (<i>stx1/stx2</i>).
Típica (tEPEC)	Região LEE (<i>eae</i>) e Plasmídeo EAF (<i>bfpA/bfpB</i>)
Atípica (aEPEC)	Região LEE (<i>eae</i>)
<i>E. coli</i> que produzem a toxina Stx (STEC)	Genes que codificam a toxina Stx (<i>stx1/stx2</i>)
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Região LEE (<i>eae</i>) e genes <i>stx</i> (<i>stx1/stx2</i>)
<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	Toxina LT (<i>elt</i>) e/ou Toxina ST (<i>est</i>)
<i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC)	Plasmídeo Inv (<i>ipaH</i>)
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	Plasmídeo EAEC (<i>aggR</i> e/ou <i>aataA</i>)

Os lisados bacterianos que foram utilizados como DNA molde nas reações de amplificação foram obtidos da seguinte forma: uma colônia isolada de uma placa de ágar Luria-Bertani (LB) foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 200 µL de água Milli-Q estéril submetida à fervura por 10 minutos e imediatamente resfriada em banho de gelo. Para cada reação foi utilizado 1 µL do DNA molde, 7,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 5,0 µL de H₂O livre de nucleases (incluso no GoTaq Green Master Mix) e 0,34 µM de cada iniciador. As sequências dos iniciadores utilizados para a identificação dos patotipos de *E. coli* diarreioagênica estão listadas na tabela 2.

Tabela 2. Sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR para a identificação de *E. coli* diarréiogênica.

Gene	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento	Referência
<i>eae</i>	CTGAACGGCGATTACGCGAA CCAGACGATACGATCCAG	52°C	917 pb	REID et al. (1999)
<i>bfpA</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	52°C	326 pb	TORNIEPO RTH et al., (1995)
<i>bfpB</i>	GACACCTCATTGCTGAAGTCG CCAGAACACCTCCGTTATGC	63°C	910 pb	MÜLLER et al. (2007)
<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	52°C	180 pb	PATON & PATON (1998a)
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	49°C	255 pb	PATON & PATON (1998a)
<i>ltA</i>	GGCGACAGATTATAACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	50°C	322 pb	SCHULTSZ et al. (1994)
<i>est</i>	ATTTTTMTTCTGTATTRICTT CACCCGGTACARGCAGGATT	52°C	190 pb	ARANDA et al. (2007)
<i>ipaH</i>	GTTCTTGACCGCTTTCCGATAACCGT C GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	52°C	619 pb	TOMA et al. (2003)
<i>aggR</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	52°C	254 pb	TOMA et al. (2003)
<i>aatA</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	55°C	630 pb	SCHMIDT et al. (1995)

Após a amplificação dos fragmentos de DNA, 5 µl de cada reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose foi preparado por aquecimento, fundindo-se agarose (Agargen, Espanha) em tampão TBE 1x (Tris – ácido bórico 90 Mm, EDTA 2 Mm, pH 8,0) na concentração final de 1%. A eletroforese foi realizada utilizando como tampão de corrida também o TBE 1x em uma corrente constante de 100 V. O marcador de tamanho molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega, USA) foi utilizado para verificar o

tamanho dos produtos amplificados. As bandas foram, então, detectadas através da coloração com SYBER Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA), na concentração de 1:10.000 e visualizadas utilizando um transiluminador de luz ultravioleta, e as imagens registradas por um sistema de captação de imagens Alphamager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

As amostras de *E. coli* diarreiogênica EPEC – E2348/69 (*eae*⁺/*bfpA*⁺/*bfpB*⁺), EHEC – EDL933 (*eae*⁺/*stxI*⁺/*stx2*⁺), ETEC – H10407 (*elt*⁺/*est*⁺), EIEC – EDL1284 (*ipaH*⁺) e EAEC – 042 (*aatA*⁺/*aggR*⁺) foram empregadas como controles positivos e a amostra de *E. coli* laboratorial C600 foi empregada como controle negativo em todas as reações de PCR.

3.4. Determinação do antígeno somático (O) e do antígeno flagelar (H) nos isolados de EPEC e STEC obtidos neste estudo

Após confirmação dos isolados como EPEC e STEC através da reação em cadeia da polimerase (PCR), estes foram encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz/SP para determinação do sorotipo O:H. A identificação dos antígenos somático (O) e flagelar (H) foi realizada através de metodologia padrão, empregando antissoros específicos O1 a O181 e H1 a H56 (EWING, 1986), produzidos a partir de cepas de referência no próprio Instituto Adolfo Lutz.

3.5. Teste de Adesão com células epiteliais HeLa

As células HeLa, originárias de câncer de colo de útero, foram mantidas através de cultivos sucessivos em frascos apropriados para cultura de células (TPP, Suíça) à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco # 10569) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco # 12657) e de 1% de mistura antibiótica (PenStrep, Gibco #15140). Após a formação da monocamada celular na superfície do frasco, a cultura foi lavada com solução PBS e descolada com a adição de solução de associação tripsina-versene (ATV), seguida da agitação manual dos frascos. Após descolamento das células, a tripsina foi inativada com a adição de DMEM com 10% SFB. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células foram novamente ressuspensas em meio de cultura para contagem em câmara de Neubauer. Após determinação do número de células, estas foram diluídas em meio DMEM na concentração final de 1x10⁵ células/mL, e distribuídas em microplacas de 24 orifícios contendo lamínulas de vidro, em volume de 1 mL por orifício.

Após o repique em placas de 24 orifícios, as células HeLa (1×10^5 células/mL) permaneceram em cultura à 37°C, em atmosfera à 5% de gás carbônico por aproximadamente 48 horas, até atingirem o estágio de semiconfluência.

O teste de interação foi realizado, com isolados de EPEC, EAEC e STEC, segundo descrito por Cravioto et al. (1979), com pequenas modificações. As amostras bacterianas foram inoculadas a partir de cultura em caldo Luria Bertani por 18 horas à 37°C, na diluição 1:50, em microplacas de 24 orifícios, contendo células HeLa em meio DMEM suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino e 1% de D-manose (Sigma # M6020) e incubadas por um período de 3 horas. Logo após, foram lavadas seis vezes com PBS estéril, e, então, foram fixadas com metanol, coradas com May-Grünwald/Giemsa, e então analisadas em microscópio óptico de imersão.

Quando os isolados foram classificados como não aderentes, ou o padrão não pode ser determinado, os isolados foram submetidos a ensaios de 6 horas. Nesse ensaio mais prolongado, após 3 horas de incubação, a microplaca foi lavada com PBS estéril e reincubada por mais 3 horas com meio DMEM fresco (período de multiplicação). Após o período total de 6 horas, as preparações foram lavadas seis vezes com PBS estéril, e então, foram fixadas com metanol, para posterior coloração com May-Grünwald/Giemsa e análise do padrão de aderência, em microscópio óptico de imersão.

3.6. Teste de identificação da polimerização de actina

O Teste de polimerização da actina (FAS – *Fluorescence Actin Staining*) foi realizado segundo descrito por Knutton et al. (1989): ao final do ensaio qualitativo descrito acima, as células foram fixadas em formaldeído a 3% em PBS, permeabilizadas com 1% de Triton X-100 e incubadas, no escuro, com faloidina (Life Technologies # A12379) marcada com fluoresceína, por 20 min. As lamínulas foram lavadas em PBS, montadas em glicerol e observadas ao microscópio de fluorescência em aumento de imersão. O teste de FAS é um importante recurso utilizado no diagnóstico de EPEC e EHEC, bactérias capazes de produzir a lesão AE.

3.7. Teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas

O teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas foi realizado pela técnica da difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados (BAUER et al., 1966), conforme critérios recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas de 4 a 6 horas, em caldo BHI das amostras de *E. coli* diarréiogênicas isoladas, e ajustadas com a turbidez da escala 0.5 de McFarland. Essa suspensão foi semeada com *swab* em placas contendo ágar Mueller-Hinton. Após 10 a 15 minutos, os discos impregnados com antimicrobianos foram colocados na superfície. Os discos utilizados foram: ampicilina (AMP, 10 µg), amoxicilina – ácido clavulânico (AMC, 30 µg), cefazolina (CFZ, 30 µg), cefuroxima (CFX, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), cefepime (CPM, 30 µg), imipenem (IPM, 10 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), tobramicina (TOB, 10 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), cotrimoxazol (SUT, 25 µg). Após a incubação a 37°C por aproximadamente 18 horas os halos de inibição foram medidos (mm) para a interpretação dos resultados.

3.8. Análise estatística

Os grupos do presente estudo, pacientes e controles, foram comparados através do teste de χ^2 ou *Fisher (two-tailed)*, e valores de *P* inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Pacientes e Controles

Com o objetivo de investigarmos a prevalência de *E. coli* diarreiogênica (ECD) entre crianças menores de 05 anos de idade no município de Botucatu/SP, foram analisadas no presente estudo 200 crianças com diarreia (grupo pacientes) e 200 crianças saudáveis (grupo controles), segundo tamanho amostral estatisticamente determinado. As amostras foram coletadas no período de Março de 2013 à Setembro de 2014, totalizando 400 indivíduos.

Em 2013, os meses com maior prevalência de crianças diarreicas atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB-UNESP) foram maio, setembro e outubro, enquanto, que em 2014, os meses com maior prevalência foram fevereiro e abril. A distribuição mensal do número de crianças diarreicas incluídas neste estudo encontra-se ilustrada na Figura 4, e os dados referentes à faixa etária e o sexo das crianças diarreicas (pacientes) e saudáveis (controles), encontram-se descritos na Tabela 3.

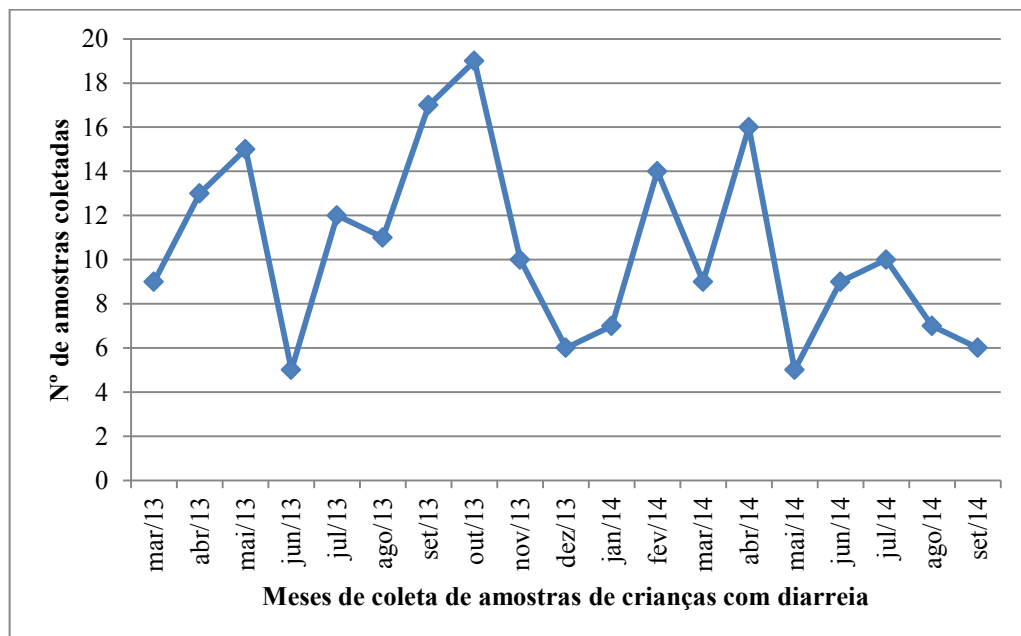


Figura 4. Incidência de casos de diarreia ocorridos entre crianças atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB – UNESP), entre os meses de Março de 2013 a Setembro de 2014.

Tabela 3. Faixa etária e sexo de crianças diarreicas (pacientes) e saudáveis (controles) incluídas neste estudo.

Características	Nº (%) de crianças:		
	Pacientes (n = 200)	Controle (n = 200)	Total (n = 400)
<i>Faixa etária (meses)</i>			
≤ 12	64 (32,0)	38 (19,0)	102 (25,5)
13 a 36	90 (45,0)	148 (74,0)	238 (59,5)
37 a 60	46 (23,0)	14 (7,0)	60 (15,0)
<i>Sexo</i>			
Masculino	112 (56,0)	109 (54,5)	221 (55,3)
Feminino	88 (44,0)	91 (45,5)	179 (44,7)

Também foram coletados dados relacionados com a ocorrência de importantes sintomas clínicos, tais como: presença de dores abdominais, febre, vômito, desidratação, e presença de sangue nas fezes. Essas informações foram obtidas através de um questionário aplicado pelo médico responsável pelo atendimento das crianças no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB, UNESP). Este questionário encontra-se no Anexo 2.

Dentre os sintomas investigados, os mais comuns foram febre e vômito, detectado em 41% e 28,4% das crianças diarreicas, respectivamente. Dor abdominal foi detectada em 10,23% das crianças, enquanto apenas 1,7% encontravam-se desidratadas. A presença de sangue nas fezes foi relatada em 25,7% das crianças diarreicas incluídas neste estudo (Figura 5).

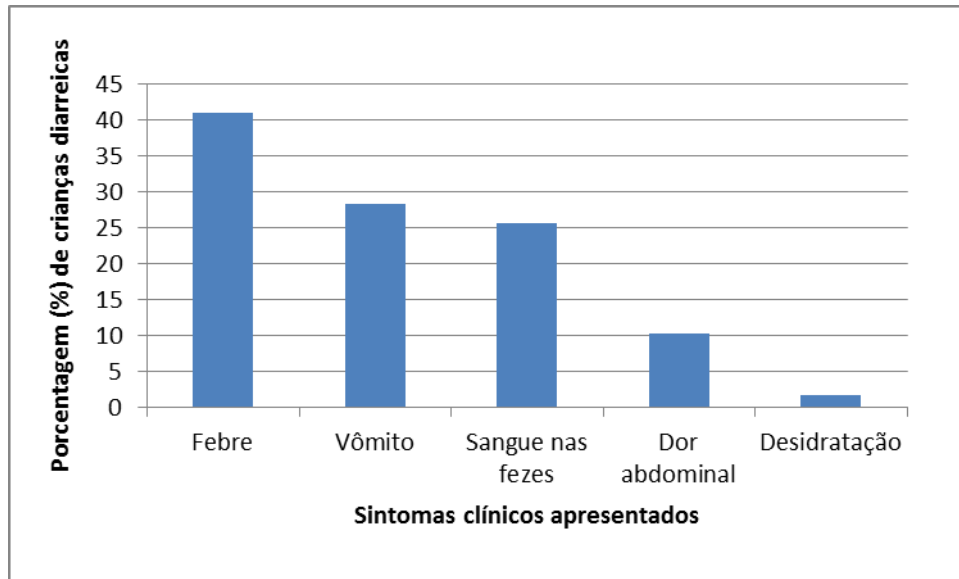


Figura 5. Principais sintomas clínicos observados entre as crianças diarreicas (pacientes) incluídas neste estudo.

4.2. Isolamento, identificação e caracterização dos Patótipos de *Escherichia coli* diarreiogênica (ECD) em amostras de fezes coletadas de crianças diarreicas (Pacientes) e não diarreicas (Controles)

A partir das amostras de fezes das 400 crianças analisadas neste estudo, foi obtido um total de 2.087 isolados de *E. coli*, sendo 1.127 provenientes de crianças com diarreia (pacientes), e 960 isolados provenientes de crianças saudáveis (controles).

ECD foi detectada em 18,0% das crianças diarreicas, sendo o patótipo EAEC o mais encontrado (10,0%), seguido por EPEC (8,0%). STEC e ETEC foram isolados em igual proporção, 0,5% das crianças diarreicas estudadas. Uma criança diarreica apresentou co-infecção por EAEC/ETEC (0,5%) e outra por EAEC/EPEC (0,5%), conforme descrito na Tabela 4.

Comparativamente, no grupo controle, ECD foi encontrada em 19,0 % das crianças, sendo que EAEC, como observado no grupo das crianças diarreicas, foi o patótipo mais frequente (10,0%), seguido por EPEC (9,0%). Igualmente ao observado no grupo dos pacientes, STEC e ETEC foram isolados em 0,5% das crianças estudadas. Duas co-infecções foram observadas no grupo das crianças saudáveis (controle), sendo uma por EAEC/EPEC (0,5%), e outra por EAEC/STEC (0,5%) (Tabela 4). Curiosamente o patótipo EIEC não foi isolado em nenhum dos grupos de crianças (diarreicas e saudáveis) estudados.

Tabela 4. Prevalência de crianças diarreicas (pacientes) e saudáveis (controle) infectadas com os distintos patotipos de *Escherichia coli* diarreio gênica.

Patotipos de ECD	N° (%) de crianças:		
	Pacientes (n = 200)	Controles (n = 200)	Total (n = 400)
aEPEC	15 (7,5%)	16 (8,0%)	31 (7,75)
tEPEC	0	1 (0,5%)	1 (0,25)
STEC	1 (0,5 %)	0	1 (0,25)
EAEC	18 (9,0 %)	18 (9,0 %)	36 (9,0)
ETEC	0	1 (0,5 %)	1 (0,25)
EAEC + ETEC	1 (0,5 %)	0	1 (0,25)
EAEC + aEPEC	1 (0,5 %)	1 (0,5 %)	2 (0,5)
EAEC + STEC	0	1 (0,5 %)	1 (0,25)
<i>Total</i>	36 (18,0 %)	38 (19,0 %)	74 (18,5)

ECD: *E. coli* diarreio gênica, EPEC: *E. coli* enteropatogênica, STEC: *E. coli* produtora da toxina shiga, EAEC: *E. coli* enteroagregativa e ETEC: *E. coli* enterotoxigênica.

A ocorrência dos diferentes patotipos de ECD nas distintas faixas etárias encontra-se descrita na tabela 5. Uma prevalência do patotipo EAEC pode ser observada na faixa etária de 13 a 36 meses, em ambos os grupos de crianças estudados. Não foram obtidas outras ocorrências expressivas, entretanto, é importante observar que o único isolado de STEC, do grupo de pacientes, tenha sido encontrado no primeiro ano de vida.

Curiosamente ECD foi mais prevalente entre as crianças saudáveis, do que entre as crianças com diarreia incluídas neste estudo. A análise estatística revelou que nenhum dos patotipos de ECD, foi individualmente associado à doença diarreica, quando comparada a sua prevalência entre os dois grupos de crianças (diarreicas e saudáveis) estudadas ($P > 0,05$). Tal associação também não pode ser observada, mesmo quando a prevalência desses patotipos de ECD, foi investigada nas diferentes faixas etárias incluídas neste estudo ($P > 0,05$).

Tabela 5. Ocorrência dos Patotipos de *E. coli* diarreiogênica nas diferentes faixas etárias das crianças diarreicas (Pacientes) e saudáveis (Controles) incluídas neste estudo.

Faixa etária ^a	Nº (%) de crianças infectadas com os distintos patotipos de ECD						
	EPEC	STEC	EAEC	ETEC	EAEC + ETEC	EAEC + EPEC	EAEC + STEC
Pacientes							
0-12 (n = 64)	4 (6,3)	1 (1,6)	4 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
13-36 (n = 90)	6 (6,7)	0 (0,0)	13 (14,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)	0 (0,0)
37-60 (n = 46)	5 (10,9)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total (n = 200)	15 (7,5)	1 (0,5)	18 (9,0)	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,5)	0 (0,0)
Controles							
0-12 (n = 38)	4 (10,5) ^b	0 (0,0)	4 (10,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
13-36 (n = 148)	12 (8,1)	0 (0,0)	13 (8,8)	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (0,7)	1 (0,7)
37-60 (n = 14)	1 (7,1)	0 (0,0)	1 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total (n = 200)	17 (8,5)	0 (0,0)	18 (9,0)	1 (0,5)	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,5)

ECD: *E. coli* diarreiogênica, EPEC: *E. coli* enteropatogênica, STEC: *E. coli* produtora da toxina shiga, EAEC: *E. coli* enteroagregativa e ETEC: *E. coli* enterotoxigênica. ^aFaixa etária das crianças diarreicas e saudáveis apresentada em meses. ^bIncluindo o isolado de tEPEC C209-2 (*eae*⁺/*bfpA*⁺/*bfpB*⁺).

Entre as crianças diarreicas deste estudo, todos os isolados de EPEC foram classificados como atípica (aEPEC) por não albergarem o gene *bfpA*, que codifica a pilina da fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*), e o gene *bfpB*, também localizado no operon *bfp*. Entretanto, no grupo controle, dois isolados de EPEC apresentaram o gene *bfpA* (C001-10 e C209-2), sendo que o isolado C209-2, também foi positivo para o outro gene do operon *bfp* pesquisado, *bfpB*. A classificação dos isolados de EPEC, portadores dos genes *bfpA* e/ou *bfpB*, obtidos a partir das fezes de crianças do grupo controle, em típica ou atípica, será dependente dos testes de interação com células epiteliais (HeLa) cultivadas *in vitro*, conforme sugerido por Trabulsi e colaboradores (TRABULSI et al., 2002).

Os dois isolados de STEC, obtidos neste estudo, foram positivos apenas para o gene *stx1*, não sendo detectado o gene *stx2* em nenhum isolado de *E. coli* obtido a partir das fezes das crianças incluídas neste estudo. Além do gene que codifica a toxina Shiga (*stx1*), o isolado obtido de um paciente diarreico, de 10 meses de idade, foi também positivo para o gene *eae*, indicando ser este isolado portador do *locus of enterocyte effacement* (Região LEE).

Quanto ao patotipo EAEC, 90,0% dos isolados obtidos a partir das fezes de crianças diarreicas, e 85,0% dos isolados obtidos a partir das fezes de crianças saudáveis, foram positivos para ambos os marcadores do patotipo EAEC pesquisados (*aatA* e *aggR*), indicando serem esses isolados EAEC típicas.

O isolado de ETEC obtido das fezes de uma criança diarreica, com 55 meses de idade, foi positivo tanto para o gene que codifica a toxina termo-lábil (*ltA*), como para o gene responsável por codificar a toxina termoestável (*est*). Diferentemente do observado com o isolado de ETEC obtido a partir de uma criança diarreica, o isolado de ETEC obtido a partir das fezes de uma criança do grupo controle foi positivo apenas para o gene que codifica a toxina LT (*ltA*). Todos os genes de virulência identificados nos isolados de ECD, obtidos neste estudo, encontram-se relacionados na Tabela 6.

Tabela 6. Relação dos genes de virulência identificados nos isolados de *E. coli* diarreio gênica obtidos neste estudo.

Pacientes		Controles	
EPEC	Genes de Virulência^a	EPEC	Genes de Virulência^a
P011-3	<i>eae</i>	C001-10	<i>eae, bfpA</i>
P033-3	<i>eae</i>	C018-1	<i>eae</i>
P040-5	<i>eae</i>	C048-1	<i>eae</i>
P047-5	<i>eae</i>	C068-2	<i>eae</i>
P102-3	<i>eae</i>	C072-1	<i>eae</i>
P116-3	<i>eae</i>	C078-2	<i>eae</i>
P127-3	<i>eae</i>	C085-1	<i>eae</i>
P138-7	<i>eae</i>	C086-10	<i>eae</i>
P149-8	<i>eae</i>	C105-1	<i>eae</i>
P163-1	<i>eae</i>	C113-1	<i>eae</i>
P166-3	<i>eae</i>	C117-1	<i>eae</i>
P175-4	<i>eae</i>	C135-1	<i>eae</i>
P192-10	<i>eae</i>	C141-1	<i>eae</i>
P219-2	<i>eae</i>	C142-2	<i>eae</i>
P237-1	<i>eae</i>	C144-1	<i>eae</i>
P262-1	<i>eae</i>	C184-1	<i>eae</i>
-	-	C193-1	<i>eae</i>
-	-	C209-2	<i>eae, bfpA, bfpB</i>
STEC		STEC	
P059-9	<i>stx1, eae</i>	C022-7	<i>stx1</i>
EAEC		EAEC	
P009-3	<i>aatA, aggR</i>	C005-1	<i>aatA, aggR</i>
P020-3	<i>aatA, aggR</i>	C009-5	<i>aatA, aggR</i>
P034-4	<i>aatA, aggR</i>	C019-1	<i>aatA, aggR</i>
P038-10	<i>aatA</i>	C022-4	<i>aatA, aggR</i>
P052-6	<i>aatA, aggR</i>	C026-4	<i>aatA, aggR</i>
P069-7	<i>aatA, aggR</i>	C027-5	<i>aatA, aggR</i>
P072-6	<i>aatA, aggR</i>	C035-6	<i>aatA, aggR</i>
P099-4	<i>aatA, aggR</i>	C063-1	<i>aatA, aggR</i>
P101-4	<i>aatA, aggR</i>	C080-3	<i>aatA, aggR</i>
P103-3	<i>aatA, aggR</i>	C081-3	<i>aatA, aggR</i>
P115-5	<i>aatA, aggR</i>	C082-1	<i>aatA, aggR</i>

Continua na página seguinte

Tabela 6 – Continuação

Pacientes		Controles	
EPEC	Genes de Virulência ^a	EPEC	Genes de Virulência ^a
P142-10	<i>aatA, aggR</i>	C091-2	<i>aatA, aggR</i>
P146-7	<i>aatA, aggR</i>	C094-9	<i>aatA, aggR</i>
P157-6	<i>aatA, aggR</i>	C095-5	<i>aatA, aggR</i>
P170-6	<i>aatA, aggR</i>	C099-2	<i>aatA</i>
P179-1	<i>aatA, aggR</i>	C111-6	<i>aatA</i>
P184-1	<i>aatA, aggR</i>	C142-1	<i>aatA</i>
P188-1	<i>aatA</i>	C147-1	<i>aatA, aggR</i>
P189-2	<i>aatA, aggR</i>	C195-1	<i>aatA, aggR</i>
P192-4	<i>aatA, aggR</i>	C200-2	<i>aatA, aggR</i>
ETEC		ETEC	
P034-6	<i>ltA, est</i>	C067-4	<i>ltA</i>

^a Os genes de virulência pesquisados no presente estudo foram: *eae, bfpA, bfpB, stx1, stx2, ltA, est, ipaH, aatA* e *aggR*. EPEC: *E. coli* enteropatogênica, STEC: *E. coli* produtora da toxina shiga, EAEC: *E. coli* enteroagregativa e ETEC: *E. coli* enterotoxigênica.

4.3. Determinação dos antígenos somático (O) e flagelar (H) dos isolados de EPEC e STEC deste estudo

O antígeno somático (O) e o antígeno flagelar (H) dos isolados de EPEC e STEC foram determinados. Dentre os isolados de EPEC, provenientes das fezes de crianças diarreicas, pudemos observar que 31,25% pertencem aos sorogrupos clássicos de EPEC, conforme relacionado na Tabela 7. Comparativamente aos resultados de sorotipagem obtidos nos isolados provenientes dos pacientes, observamos que entre os isolados de EPEC, provenientes das fezes de crianças saudáveis, apenas 22,2% pertencem aos sorogrupos clássicos de EPEC. É notável que em ambos os grupos estudados a maioria dos isolados de EPEC não pertence aos sorogrupos clássicos, sendo o único isolado de tEPEC, obtido neste estudo, pertencente ao sorotipo O113:H7.

Os isolados de STEC, proveniente de uma criança diarreica (P059-9) e de uma criança saudável (C022-7) foram classificados nos sorotipos O26:H11 e O119:H7, respectivamente.

Tabela 7. Determinação do antígeno somático (O) e do antígeno flagelar (H) dos isolados de EPEC típica e atípica identificados neste estudo.

Sorotipos (Nº) encontrados nos isolados de EPEC:		
	Pacientes (n = 16)	Controles (n = 18)
Sorogrupos Clássicos de EPEC	O26:H11 (1), O55:H2 (1), O55:H7 (1), O119:H2 (1)	O55:H ⁻ (1), O119:H2 (1), O126:H19 (1), O142:H34 (1)
Sorogrupos Não-EPEC	O62:H ⁻ (1), O103:H25 (1), O107:H40 (1), O118:H ⁻ (1), O145:H34 (1), O157:H16 (1), ONT:H5 (1), ONT:H16 (1), ONT:H17 (2)	O3:H8 (1), O21:H21 (1), O63:H ⁻ (1), O103:H33 (1), O109:H25 (1), O113:H7 ^a (1), O132:H ⁻ (1), O177:H9 (1), ONT:H8 (1), ONT:H17 (1), ONT:H46 (1), ONT:H ⁻ (2), OR:H33 (1)

ONT: amostra não-tipável para o antígeno somático O com os antissoros testados (O1 a O181); H⁻: isolado de aEPEC imóvel. ^aIsolado de tEPEC C209-2 (*ea*⁺/*bfpA*⁺/*bfpB*⁺).

4.4. Teste de interação dos Patotipos EPEC, STEC e EAEC com células epiteliais (HeLa) cultivadas *in vitro*

Entre os isolados de EPEC, obtidos a partir de amostras de fezes de crianças diarreicas, todos foram desprovidos dos genes do operon *bfp* pesquisados (*bfpA* e *bfpB*), permitindo a classificação desses isolados como aEPEC. Portanto, nenhum desses isolados foram capazes de aderir às células HeLa em ensaios de aderência de 3 horas em um padrão característico. Entre as EPEC isoladas de pacientes, os padrões de aderência só puderam ser determinados em ensaios mais prolongados (ensaios de 6 horas), sendo que a maioria dos isolados (50%) produziu o padrão de aderência localizada-*like* (ALL), onde se observa a formação de microcolônias frouxas aderidas à superfície das células epiteliais (Figura 6). O padrão de aderência agregativo (AA) foi observado em 12,5%, enquanto o padrão difuso (AD) foi detectado somente em 6,25% dos isolados de aEPEC provenientes do grupo de crianças diarreicas. Também foram observados isolados que aderiram às células epiteliais em

um padrão não-determinado (18,75%), enquanto que 12,5% dos isolados foram classificados como não-aderentes (NA) (Figura 6).

Quando observamos os isolados de EPEC obtidos das fezes de crianças saudáveis a maioria aderiu em um padrão não-determinado (44,4%). O padrão ALL foi observado em 27,8% dos isolados, incluindo o isolado C001-10 que foi positivo para o gene *bfpA*, mas negativo para o gene *bfpB* (Tabela 6). Além do padrão ALL, o padrão AD foi observado em 11,1% dos isolados. Curiosamente, um único isolado (C209-2), produziu o padrão de aderência localizada (AL) em ensaios de 3 horas de interação. Esse isolado foi positivo para os genes *bfpA* e *bfpB*. Sendo assim, pudemos classificar o isolado C209-2 como uma EPEC típica (tEPEC) (Tabela 4). Ademais, 11,1% dos isolados de EPEC (do grupo controle) não foram capazes de aderir às células epiteliais (Figura 6).

A

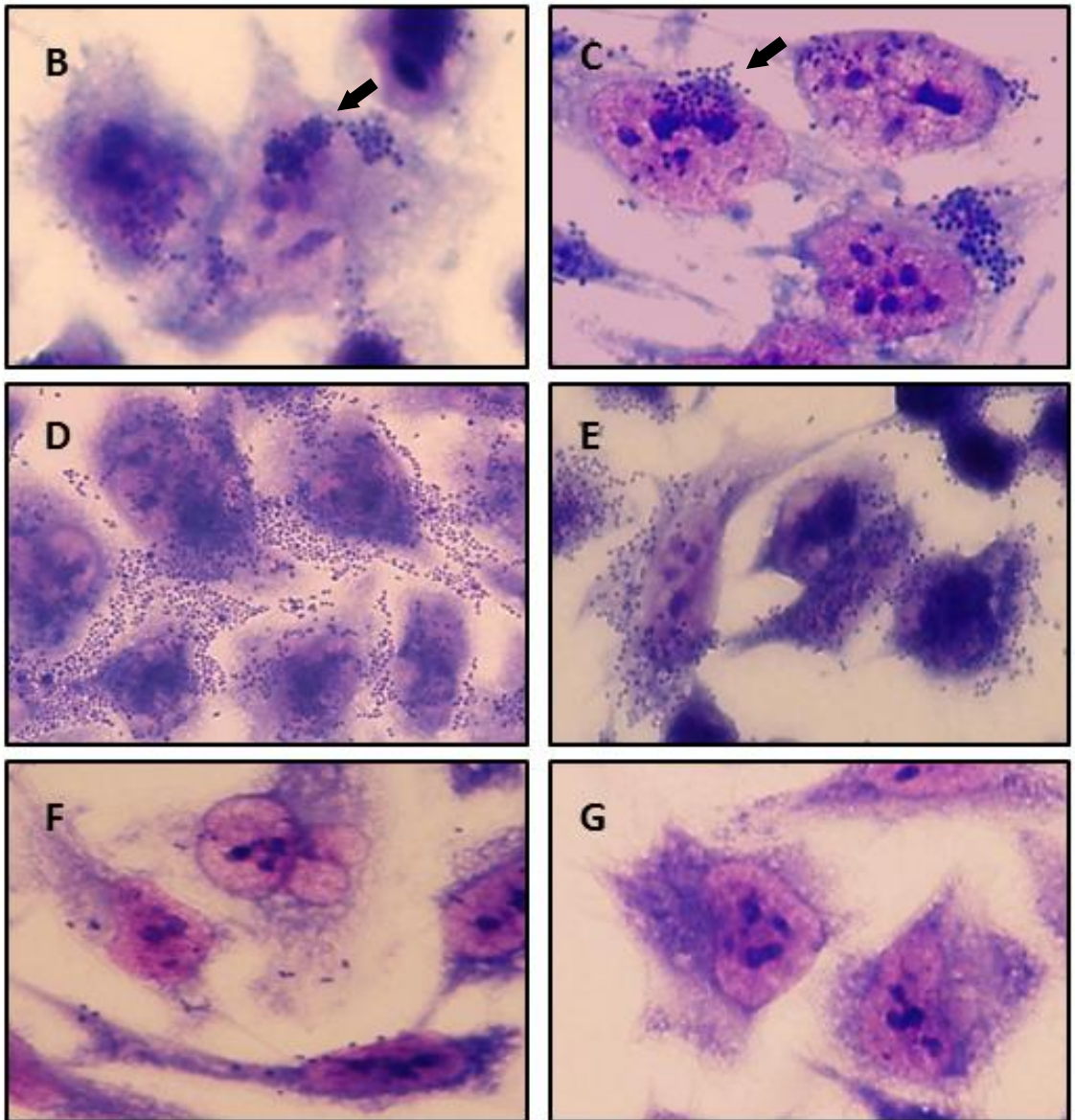
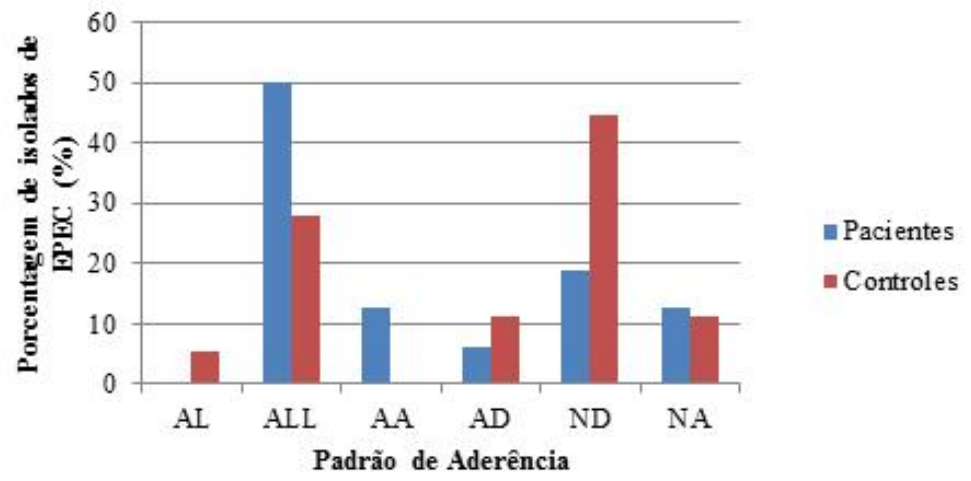


Figura 6. Microscopia óptica ilustrando os principais padrões de aderência detectados nos isolados de EPEC deste estudo. A: Prevalência dos distintos padrões de aderência no patotipo EPEC. B: isolado C209-2, aderência localizada (AL); C: isolado P033-3, aderência localizada-*like* (ALL); D: isolado P047-5, aderência agregativa (AA); E: isolado P237-2, aderência difusa (AD); F: isolado C048-1, padrão de aderência não-determinado (ND) e G: isolado C193-1, não-aderente (NA). As setas indicam a presença de microcolônias compactas (B) e frouxas (C) características dos padrões de aderência localizada e localizada-*like*, respectivamente. (Aumento final de 1.000x).

Dentre os isolados de STEC obtidos no presente estudo, o isolado P059-9 (obtido a partir das fezes de uma criança diarreica) aderiu às células HeLa no padrão ALL. É importante lembrar que esse isolado, além do gene que codifica a toxina Shiga (*stx1*), também foi positivo para o gene *eae*, indicando albergar a região LEE. O isolado C022-7 (*stx1⁺/eae⁻*), obtida de uma criança do grupo controle, não foi capaz de aderir às células epiteliais (Figura 7).

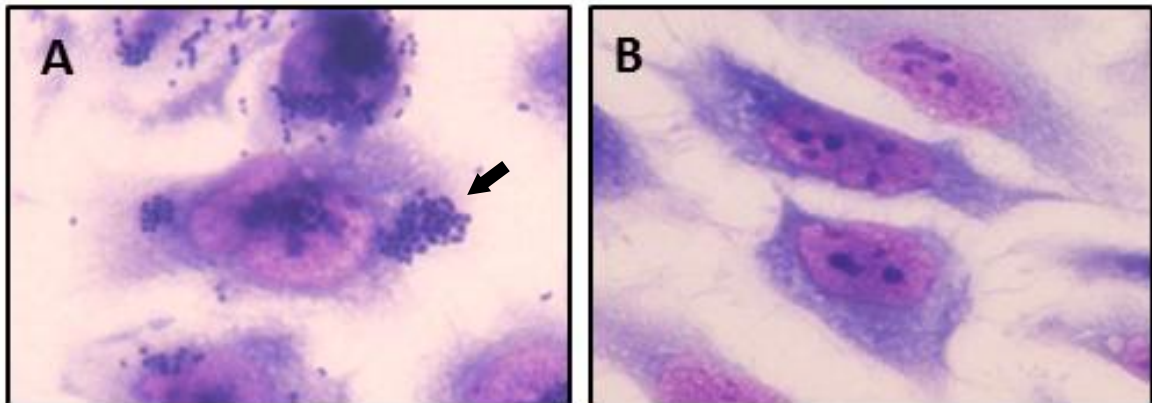


Figura 7. Microscopia óptica representando os padrões de aderência detectados nos dois isolados de STEC deste estudo. A: isolado P059-9, padrão de aderência localizada-*like* (ALL) e B: isolado C022-7, não-aderente (NA). A seta indica a presença de microcolônias frouxas (em A), característica do padrão de aderência localizada-*like* (Aumento final de 1.000x).

Entre os 18 isolados de EAEC típicas (*aatA*⁺/*aggR*⁺), obtidos do grupo de crianças diarreicas, 15 isolados (83,3%) produziram o padrão agregativo característico desse patótipo, enquanto 3 isolados (16,7%) não foram capazes de aderir às células HeLa. Entre os 2 isolados de EAEC atípica (*aatA*⁺/*aggR*⁻) do grupo dos pacientes, um único isolado (P038-10) aderiu em um padrão não-determinado, observando-se apenas bactérias isoladas, enquanto o outro isolado de EAEC atípica (P188-1) foi incapaz de aderir às células HeLa (Figura 8). É importante ressaltar que em um isolado de EAEC típica (P069-7), que produziu o padrão AA, foi possível observar concomitantemente o padrão CLA (*chain-like adherence*), caracterizado pela presença de bactérias aderidas em forma de cadeia (Figura 8E).

Comparativamente, entre as EAEC obtidas a partir das fezes de crianças saudáveis, o padrão AA foi observado em 58,8% dos isolados de EAEC típica. Dois isolados (C026-4 e C035-6) aderiram em um padrão não-determinado (ND), enquanto que, 23,5% dos isolados foram incapazes de interagir com as células HeLa cultivadas *in vitro*. Um único isolado de EAEC típica (C019-1) produziu destacamento celular em ensaios de 6 horas de interação. Foram obtidos 3 isolados de EAEC atípica do grupo de crianças sem diarreia, sendo que dois desses isolados produziram o padrão AA (66,7%), enquanto, que um único isolado (33,3%) foi classificado como não-aderente (Figura 8D).

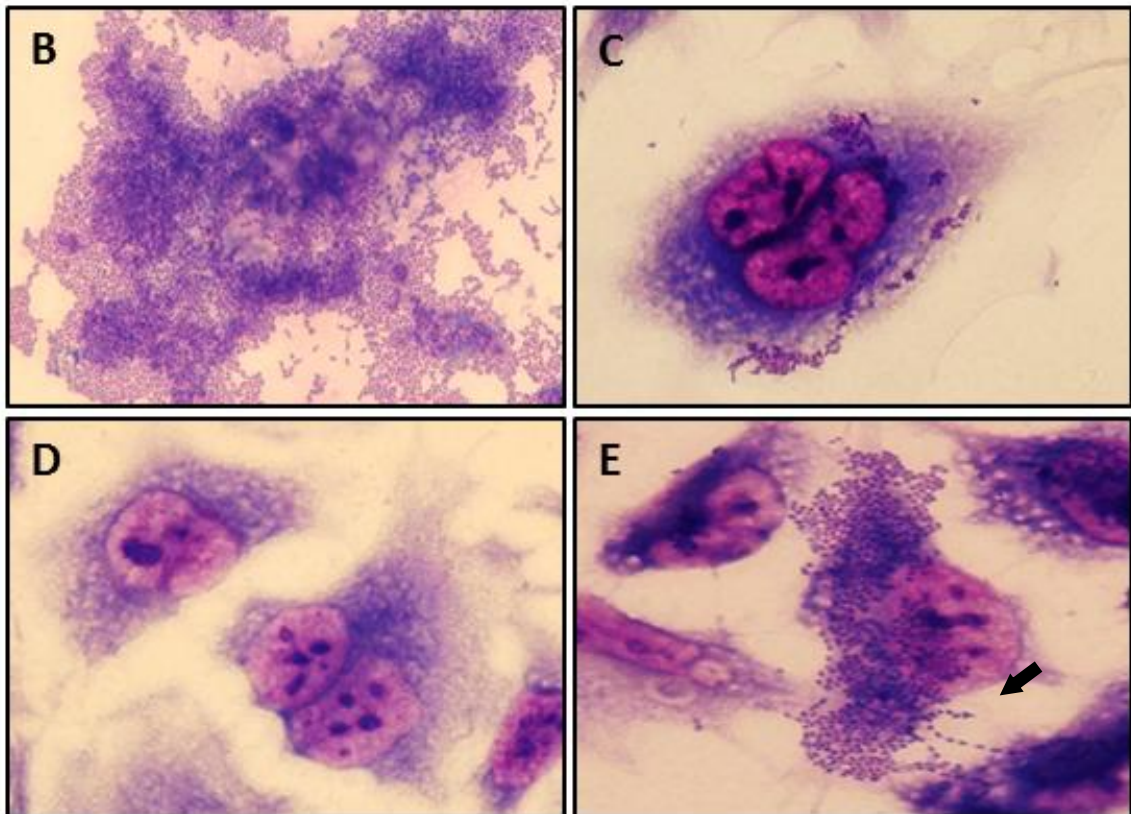
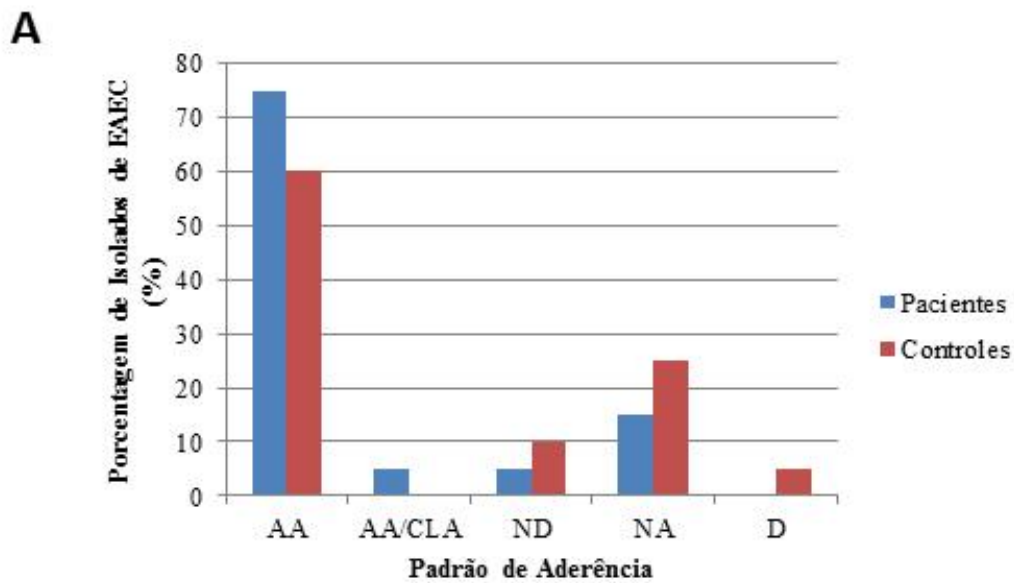


Figura 8. Microscopia óptica ilustrando os principais padrões de aderência detectados nos isolados de EAEC obtidos neste estudo. A: Prevalência dos distintos padrões de aderência entre isolados do patotipo EAEC. B: Padrão de aderência agregativa (AA) detectado no isolado C082-1; C: Padrão de aderência não-definido (ND), observado no isolado C035-6; D: Não-aderente (NA), observado no isolado C063-1 e E: Padrão híbrido de aderência AA/CLA (agregativa e *chain-like*) detectado no isolado EAEC P69-7. A seta indica a presença de bactérias arranjadas em cadeias (em E), característica do padrão de aderência *chain-like* (CLA) (Aumento final de 1.000x).

Todos os resultados referentes à interação dos patótipos EPEC, STEC e EAEC com células epiteliais (HeLa), cultivadas *in vitro*, encontram-se sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8. Relação dos padrões de aderência encontrados nos patótipos EAEC típica e atípica, EPEC típica e atípica e STEC, nos grupos estudados (Pacientes e Controles).

Patótipos de ECD ^a	N° de Isolados	N° (%) de isolados produzindo os respectivos padrões de aderência ^b :						
		AL	ALL	AA	AD	ND	NA	D
tEAEC								
Pacientes	18	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (83,3) ^c	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (16,7)	0 (0,0)
Controles	17	0 (0,0)	0 (0,0)	10 (58,8)	0 (0,0)	2 (11,8)	4 (23,5)	1 (5,9)
aEAEC								
Pacientes	2	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Controles	3	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (66,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	0 (0,0)
tEPEC								
Pacientes	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Controles	1	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
aEPEC								
Pacientes	16	0 (0,0)	8 (50,0)	2 (12,5)	1 (6,2)	3 (18,8)	2 (12,5)	0 (0,0)
Controles	17	0 (0,0)	5 (29,4)	0 (0,0)	2 (11,8)	8 (47,0)	2 (11,8)	0 (0,0)
STEC								
Pacientes	1	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Controles	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)

^aECD – *E. coli* diarréiogênica, tEAEC – *E. coli* enteroagregativa típica, aEAEC – *E. coli* enteroagregativa atípica, tEPEC – *E. coli* enteropatogênica típica, aEPEC – *E. coli* enteropatogênica atípica, STEC – *E. coli* produtora da toxina Shiga. ^bAL – aderência localizada, ALL – aderência localizada-like, AA – aderência agregativa, AD – aderência difusa, ND – não-determinado, NA – não-aderente, D – destacante. ^c Isolado P069-7 apresentou padrão agregativo concomitantemente com *chain-like* (CLA).

4.5. Teste de identificação da polimerização de actina

A habilidade dos isolados de EPEC e STEC (*eae*⁺) em induzir a lesão AE, foi indiretamente avaliada através do teste de FAS. Com exceção de dois isolados de aEPEC não-aderentes, proveniente de crianças diarreicas, todos os demais isolados foram positivos para o teste de FAS (Tabela 7), indicando seu potencial de induzir a formação do pedestal característico da lesão AE, quando em contato com células epiteliais. O único isolado de STEC *eae*⁺, também mostrou potencial em induzir a lesão AE através do teste de FAS, mostrando que o isolado P059-9 (*stxI*⁺/*eae*⁺) apresenta uma região LEE funcional.

Foram obtidas a partir das fezes de crianças saudáveis incluídas neste estudo, 17 aEPEC e um único isolado de tEPEC (Tabela 4). O teste de FAS, revelou que entre as aEPEC, um único isolado, que aderiu as células HeLa em um padrão não-determinado, foi incapaz de promover o acúmulo de actina abaixo do sítio de aderência (Figura 9), indicando sua inabilidade em induzir a lesão AE. Com exceção do isolado de aEPEC C144-1 (FAS negativo), todos os demais isolados de aEPEC, o isolado de tEPEC C209-2, foram positivos para o teste de FAS (Tabela 7).

Tabela 9. Teste de FAS (*Fluorescence Actin Staining*) para identificação do acúmulo de actina característico da Lesão *attaching and effacing* (AE) nos isolados de EPEC e STEC (*eae*⁺) produzindo distintos padrões de aderência em células HeLa, cultivadas *in vitro*.

Padrão de Aderência	Nº (%) de isolados:					
	Pacientes			Controles		
	aEPEC (n = 16)	tEPEC (n = 0)	STEC (n = 1)	aEPEC (n = 17)	tEPEC (n = 1)	STEC (n = 1)
AL						
FAS +	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
FAS -	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
ALL						
FAS +	8 (50,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	5 (29,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
FAS -	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
AA						
FAS +	2 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
FAS -	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
AD						
FAS +	1 (6,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (11,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
FAS -	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
ND						
FAS +	3 (18,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (41,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
FAS -	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
NA	2 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (11,7)	0 (0,0)	1 (100,0)

aEPEC – *E. coli* enteropatogênica atípica, tEPEC - *E.coli* enteropatogênica típica, STEC – *E. coli* produtora da toxina Shiga, AL – aderência localizada, ALL – aderência localizada-like, AA – aderência agregativa, AD – aderência difusa, ND – não-determinado, ALL/AD – aderência localizada-like concomitantemente com aderência difusa, NA – não aderente.

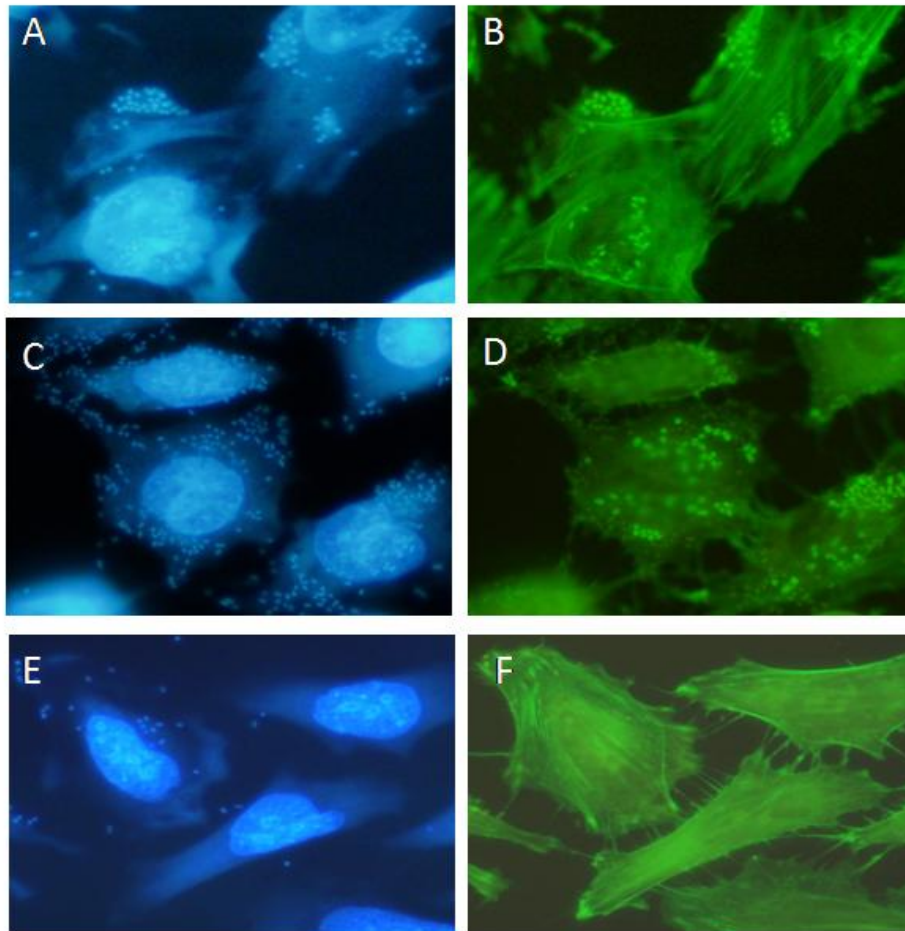


Figura 9. Microscopia de fluorescência representando o teste de identificação da polimerização de actina (FAS positivo) nos isolados P262-1 (A e B; padrão ALL) e C018-1 (C e D; padrão AD) e ausência do acúmulo de actina (FAS negativo) no sitio de aderência do isolado C144-1 (E e F; padrão ND). A, C e E: marcação com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) mostrando as bactérias aderidas às células HeLa. B e D: teste de FAS positivo e F: teste de FAS negativo. DAPI (azul): marcando o ácido nucléico das bactérias e da célula epitelial; Faloidina (verde), marcando a F-actina celular.

4.6. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Embora grande parte dos isolados de ECD, obtidos neste estudo, tenha sido sensível a maioria dos antibióticos testados, pudemos observar que isolados do patotipo EAEC e EPEC, provenientes das fezes de crianças diarreicas, apresentaram resistência a Ampicilina (75,0% dos isolados do patotipo EAEC e 12,5% dos isolados do patotipo EPEC) e Cotrimoxazol (6,25% dos isolados de EAEC e 45,0% dos isolados de EPEC)

Entre os isolados de ECD, provenientes das fezes de crianças saudáveis, também observamos resistência para Ampicilina (50,0% dos isolados do patotipo EAEC e 33,3% dos isolados do patotipo EPEC), Cotrimoxazol (30,0% dos isolados do patotipo EAEC e 33,3% dos isolados do patotipo EPEC), além de Gentamicina (5,0% dos isolados do patotipo EAEC e 5,6% dos isolados do patotipo EPEC), conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10. Relação de antibióticos e prevalência de resistência (%) entre os isolados de ECD identificados neste estudo.

Antibióticos ^a	Porcentagem (%) de isolados:							
	Paciente				Controles			
	EPEC (n = 16)	EAEC (n = 20)	STEC (n = 1)	ETEC (n = 1)	EPEC (n = 18)	EAEC (n = 20)	STEC (n = 1)	ETEC (n = 1)
AMP	12,5	75,0	0	0	33,3	50,0	100,0	0
AMC	0	0	0	0	0	0	0	0
CFZ	0	0	0	0	0	0	0	0
CRX	0	0	0	0	0	0	0	0
CTX	0	0	0	0	0	0	0	0
CPM	0	0	0	0	0	0	0	0
IPM	0	0	0	0	0	0	0	0
GEN	0	0	0	0	5,6	5,0	0	0
TOB	0	0	0	0	0	0	0	0
CIP	0	0	0	0	0	0	0	0
SUT	6,25	45,0	0	0	33,3	30,0	100,0	0

^aAmpicilina (AMP, 10 µg), amoxicilina – ácido clavulânico (AMC, 30 µg), cefazolina (CFZ, 30 µg), cefuroxima (CFX, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), cefepime (CPM, 30 µg), imipenem (IPM, 10 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), tobramicina (TOB, 10 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), cotrimoxazol (SUT, 25 µg).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram incluídas crianças de até cinco anos de idade, por compreenderem uma faixa etária amplamente acometida pela doença diarreica, e que em muitos casos, requerem cuidados médicos e hospitalizações para o tratamento desta enfermidade. A doença diarreica acomete tanto crianças de países em desenvolvimento, como o Brasil, quanto crianças de países desenvolvidos, e compreende uma das principais causas de mortalidade nessa faixa etária, por ano (KOSEK et al., 2003; PARASHAR et al., 2003; BRYCE et al., 2005). Em nossa análise, ECD foi detectada em proporção semelhante entre crianças com diarreia e crianças saudáveis. Vários estudos conduzidos por autores Brasileiros têm observado uma realidade semelhante à detectada em nosso estudo (ARAUJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; SPANO et al., 2008; MORENO et al., 2010).

EAEC tem se destacado como um dos patotipos de ECD mais frequentes entre crianças de até cinco anos de idade, no entanto, esse patotipo tem sido detectado em igual frequência entre crianças diarreicas e crianças sem diarreia, conforme observado também neste estudo (BUERIS et al., 2007; ARAUJO et al., 2007). Um estudo anterior, avaliando a prevalência dos diferentes patotipos de ECD entre crianças com diarreia, realizado na cidade de Botucatu na década de 90, já apontava a importância desse patotipo como um agente da doença diarreica entre crianças em nossa cidade (RODRIGUES et al., 2002).

Muito embora a detecção do padrão agregativo (AA) em isolados de *E. coli*, quando em contato com células HeLa, compreendam a principal ferramenta para a detecção desse patotipo, alguns estudos tem demonstrado claramente uma correlação satisfatória entre a detecção do padrão AA e a ocorrência de importantes marcadores de virulência presentes no plasmídeo de EAEC, tais como, o gene *aata* (que corresponde ao fragmento sonda de EAEC, originalmente denominado CVD432, utilizado para diagnóstico) e o gene *aggR* (que codifica um regulador transcricional) (GOMES et al., 1998; LOZER et al., 2013). Frente a essas observações, em nosso estudo, o patotipo EAEC foi identificado com base na presença dos genes *aata* e/ou *aggR*, sendo o patotipo EAEC, detectado em igual proporção nos dois grupos de crianças estudadas.

EPEC, um dos primeiros grupos de *E. coli* a serem identificados como patógeno, também mostrou-se bastante prevalente entre as crianças deste estudo, no entanto, uma análise comparativa entre crianças diarreicas e crianças saudáveis, não permitiu a associação desse patotipo com a doença diarreica. A associação de patotipo EPEC, especialmente das aEPEC, com a doença diarreica tem sido um assunto bastante controverso na literatura.

Embora alguns estudos tenham detectado tal associação (SCALETSKY et al, 2002; ORLANDI et al., 2005), muitos outros estudos têm encontrado esse patógeno com similar frequência entre crianças diarreicas e crianças saudáveis (BUERIS et al., 2007; SPANO et al., 2008).

Todos os isolados de EPEC, provenientes das fezes de crianças com diarreia, foram negativos para os genes presentes no plasmídeo de virulência EAF (*bfpA* e *bfpB*) investigados, permitindo assim, sua classificação como aEPEC. Em contrapartida, dois isolados, provenientes das fezes de crianças saudáveis, foram positivos para o gene *bfpA*, sendo que um desses isolados, albergava concomitantemente o gene *bfpB*. Os testes de interação com células HeLa, cultivadas *in vitro*, mostrou que somente o isolado C209-2 (*bfpA*⁺/*bfpB*⁺) produziu o padrão de aderência localizada (AL) em ensaios de 3 horas, sendo portanto, o único isolado de tEPEC identificado no presente estudo. Estudos da literatura, realizados em diferentes continentes, têm demonstrado que atualmente as aEPEC são mais prevalentes que as tEPEC (revisado em OCHOA et al., 2009). Em nosso estudo, também pudemos identificar essa realidade, sendo o único isolado de tEPEC obtido a partir das fezes de uma criança sem diarreia (grupo controle).

Bortolini e colaboradores (BORTOLINI et al., 1999) demonstraram uma deleção no operon *bfp* em isolados de EPEC dos sorotipos O119:H2 e O128:H2. Esses isolados hibridaram com a sonda *bfpA*, mas não com outras sondas do operon *bfp*, e conseqüentemente foram incapazes de aderir as células HeLa no padrão AL. Acreditamos que uma realidade semelhante a observada por Bortolini e colaboradores possa explicar o fato do isolado C001-10 (ONT:H8) ser positivo para o gene *bfpA* e não aderir as células epiteliais em ensaios de 3 horas no padrão AL, uma vez que esse isolado foi negativo para o gene *bfpB*, e provavelmente, apresenta uma significativa deleção nesse operon, impedindo assim a produção de BFP. É importante ressaltar que esse isolado apenas foi capaz de aderir as células HeLa em ensaios de 6 horas produzindo o padrão ALL, caracterizado pela presença de colônias frouxas aderidas a superfície das células epiteliais. Isolados positivos para o gene *bfpA* (por hibridação ou PCR), mas incapazes de produzir o padrão AL (em 3 horas), também têm sido observados por outros autores em isolados classificados como aEPEC de distintos sorotipos (GOMES et al., 2011; PITONDO-SILVA et al., 2015).

Os isolados de STEC e ETEC têm sido identificados em baixa frequência entre crianças Brasileiras (ARANDA et al., 2007; ARAUJO et al., 2007; SPANO et al., 2008; MORENO et al., 2010; OSAWA et al., 2013), sendo que, neste estudo ambos os patótipos foram detectados em apenas uma criança de cada grupo estudado. Uma prevalência um pouco

distinta foi observada na Bahia, em 2005, onde além do patotipo aEPEC (detectado em 10,1% das crianças diarreicas), pudemos observar que o patotipo ETEC foi o segundo mais prevalente, tendo sido detectado em 7,5% das crianças estudadas (FRANZOLIN et al., 2005). No Brasil, até o final da década de 90, existiam poucos dados sobre a ocorrência de infecções por STEC. Entretanto, após o primeiro relato de isolamento de amostras do sorotipo O157:H7 associadas a infecções humanas (IRINO et al., 2002) e do primeiro caso de SHU relacionado ao sorotipo O26:H11 (GUTH et al., 2002), um considerável esforço foi realizado com o objetivo de se compreender a real situação das STEC em nosso país. Avanços foram obtidos e, em uma série de estudos retrospectivos, pesquisadores brasileiros deflagraram a presença de clones potencialmente virulentos, pertencentes ao sorotipo O157:H7 (IRINO et al., 2002) e sorogrupos não-O157, em nosso meio, desde o final da década de 70 (VAZ et al., 2004; GUTH et al., 2005). Os dois isolados de STEC obtidos neste estudo foram identificados como pertencentes aos sorotipos O26:H11 e O119:H7. O isolado de STEC proveniente de uma criança diarreica, P059-9 (pertencente ao sorotipo O26:H11) além do gene que codifica a toxina Shiga 1 (*stx1*), também foi positivo para o gene *eae*, mostrando ser esse isolado portador da região LEE.

Neste estudo, foram encontrados 2,0% de indivíduos infectados por mais de um patotipo (co-infecção), sendo duas co-infecções entre as crianças diarreicas, pelos patotipos EAEC/ETEC e EAEC/aEPEC, e duas co-infecções entre as crianças saudáveis, pelos patotipos EAEC/aEPEC e EAEC/STEC. Casos como esses, são observados, mesmo que em baixa frequência, em outras pesquisas realizadas no Brasil (SOUZA et al., 2002; MORENO et al., 2010). Em animais, a co-infecção pode ser importante para que ocorra a manifestação clínica. Estudos têm demonstrado que a infecção por um único agente, pode compreender manifestações clínicas mais brandas ou não serem manifestadas (NEOG, 2011).

A prevalência dos distintos patotipos de ECD em frequência semelhante entre os dois grupos de crianças estudadas, compreende uma preocupação bastante relevante nos dias atuais, abrindo importantes questões no processo de identificação desse patógeno. Muito embora parte dessa realidade possa ser atribuída ao caráter heterogêneo dos patotipos EAEC e EPEC, características próprias do hospedeiro também podem contribuir para essa observação. A ocorrência de EAEC e EPEC em crianças sem diarreia, e que não apresentaram distúrbios gastrointestinais, pelo menos 30 dias antes de serem incluídas neste estudo, pode apresentar várias explicações. Defesas imunológicas adquiridas mesmo antes do nascimento são fundamentais para que ocorra uma barreira às infecções, como as provocadas pelas ECD. O efeito resultante do aleitamento materno é considerado fundamental para impedir que

microrganismos consigam aderir ou até mesmo invadir a mucosa intestinal de crianças, em seus primeiros seis meses de vida (WILLER et al., 2004; WHO, 2013). Outra possível explicação para essa questão é que alguns receptores celulares de superfície possam estar ausentes em hospedeiros assintomáticos. Ademais, a microbiota intestinal, a camada de muco e a resposta imune inata também podem constituir outras importantes barreiras que impedem que esses patógenos, mesmo quando presentes no hospedeiro, possam levar a doença diarreica (LEVINE; ROBINS-BROWNE, 2012). O número de patógenos ao qual o hospedeiro tem contato também pode influenciar significativamente na severidade das manifestações clínicas, bem como a especificidade de alguns enteropatógenos com seu hospedeiro, onde bactérias com fatores de virulência específicos para animais, como em suínos e bovinos, não seriam capazes de provocar diarreia, mas seriam excretados normalmente nas fezes desse hospedeiro (LEVINE; ROBINS-BROWNE, 2012).

Além da prevalência dos patótipos de ECD, em crianças diarreicas e saudáveis, nosso estudo também se propôs determinar algumas importantes características utilizadas para o diagnóstico, bem como para inferir o potencial patogênico dos isolados de ECD obtidos neste estudo. Dentre estas características, a primeira propriedade investigada foi a habilidade dos isolados de EPEC, STEC e EAEC em aderir às células epiteliais (HeLa), produzindo um padrão de aderência característico das ECD. O primeiro grupo investigado foi o das EPEC, onde juntamente com os genes de virulência identificados, utilizamos o padrão de aderência, para classificar esses isolados em típicas e atípicas. Todos os 16 isolados de EPEC, provenientes das fezes de crianças com diarreia, foram desprovidos dos genes *bfpA* e *bfpB*, permitindo assim, sua classificação como aEPEC. Na ausência de BFP, era de se esperar que nenhum dos 16 isolados de aEPEC, fossem capazes de aderir às células HeLa, em ensaios de 3 horas, produzindo o padrão AL. O padrão ALL, foi detectado em 30,3% das aEPEC obtidas neste estudo. Estudos, focando a caracterização de isolados de aEPEC, têm demonstrado que entre isolados onde é possível determinar um padrão de aderência, o padrão ALL tem se demonstrado um dos mais prevalentes (SCALETSKY et al., 2010). Muitos isolados (33,3%), deste estudo, foram capazes de aderir às células HeLa. No entanto, o padrão de aderência produzido a partir dessa interação, não pôde ser determinado.

Embora alguns estudos tenham demonstrando um grande número de isolados de aEPEC não-aderentes (ABE et al., 2009; SCALETSKY et al., 2010), em nosso estudo, somente 12,1% dos isolados obtidos foram incapazes de aderir às células epiteliais. Como já observado em estudos anteriores, alguns isolados classificados como a EPEC também são capazes de aderir às células epiteliais em padrões de aderência característicos de outros

patotipos de ECD, como o padrão AA, característico do patotipo EAEC, e o padrão AD, característico do patotipo DAEC (VIEIRA et al., 2001; ABE et al., 2009; SCALETSKY et al., 2010; PITONDO-SILVA et al., 2015). Em nossa pesquisa, 6,0% e 9,0% dos isolados de aEPEC foram capazes de produzir o padrão AA e AD, respectivamente.

Foram obtidos neste estudo somente dois isolados de STEC, sendo que um aderiu às células epiteliais no padrão ALL, enquanto o outro isolado, obtido a partir das fezes de uma criança saudável, foi classificado como não aderente. O isolado de STEC P059-9, que produziu o padrão ALL, foi identificado como pertencente ao sorotipo O26:H11. Um estudo recentemente publicado demonstrou ser o padrão ALL, bastante frequente entre isolados de STEC pertencentes ao sorogrupo O26 (PIAZZA et al., 2013).

O padrão AA, foi observado tanto em isolados de EAEC típica (*aatA*⁺/*aggR*⁺), como em isolados de EAEC atípica (*aatA*⁺/*aggR*⁻). Nossos resultados demonstraram que 71,4 e 60% dos isolados de tEAEC e aEAEC produziram o padrão AA, respectivamente. O diagnóstico do patotipo EAEC compreende uma missão bastante complexa ainda nos dias atuais, e a detecção do padrão AA em ensaios de aderência com células epiteliais (HeLa ou HEp-2) ainda continuam sendo a ferramenta mais apropriada para este propósito. Um estudo realizado por Gomes e colaboradores (GOMES et al., 1998) demonstrou que aproximadamente 67,1% dos isolados de *E. coli* que produziram o padrão AA (em 3 ou 6 horas), também hibridaram com a sonda EAEC (que corresponde ao gene *aatA*, pesquisado neste estudo). Parece-nos claro que muitos isolados deste estudo desprovidos dos genes de virulência de EAEC pesquisados, ainda possam ser capazes de produzir esse padrão de aderência em células epiteliais, e que talvez a ocorrência do patotipo EAEC seja superior à identificada neste estudo. Em um estudo posterior, a sonda EAEC hibridou com aproximadamente 50,3% dos isolados *E. coli* que aderiram as células epiteliais no padrão AA (SCALETSKY et al., 2002). Em contra partida, foram observados por Scaletsky e colaboradores (SCALETSKY et al., 2002) isolados de *E. coli* que hibridaram com a sonda EAEC, mas que aderiram as células no padrão difuso. Em nosso estudo, também pudemos observar isolados de tEAEC que aderiram em padrões distintos do padrão AA (5,7%) ou ainda isolados não-aderentes (20,0%). Dentre as aEAEC, também pudemos observar isolados que não produziram o padrão AA, sendo que 20,0% das aEAEC aderiram em um padrão não-determinado, e 20,0% foram não-aderentes. Um único isolado de EAEC apresentou um padrão agregativo concomitantemente com o padrão CLA (*chain-like adherence*). A ocorrência do padrão CLA em isolados de ECD carregando marcadores genéticos de EAEC, como o gene *aggR*, já havia sido reportado previamente na literatura (GIOPPO et al., 2000).

Uma das primeiras ferramentas utilizadas para o diagnóstico do patótipo EPEC, foi a sorologia (ROBINS-BROWNE et al., 1984). O conhecimento dos mecanismos de virulência do patótipo EPEC só começou a ser desvendado a partir da década de 80 (NATARO; KAPER et al., 1998). Um estudo realizado no Brasil, por Vieira e colaboradores, foi pioneiro em demonstrar a ocorrência de importantes marcadores de virulência deste patótipo em isolados de *E. coli* que não pertenciam aos 12 sorogrupos clássicos de EPEC (O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158). Ademais, esse estudo revelou, que esses isolados podiam albergar genes responsáveis por codificar fatores de virulência característicos tanto de outros patótipos de ECD, bem como de ExPEC (*E. coli* extra-intestinal patogênica). Entre as aEPEC, obtidas a partir das fezes de crianças diarreicas, 68,75% dos isolados não pertencem aos sorogrupos clássicos de EPEC. A ocorrência de EPEC não pertencente aos sorogrupos clássicos nos parece uma realidade bastante frequente em estudo de epidemiológicos realizados a partir do ano 2000 (AFSET et al., 2003; DULGUER et al., 2003; ABE et al., 2009; NUNES et al., 2012).

Somente um isolado de aEPEC, proveniente das fezes de uma criança sem diarreia, foi negativo para o teste de FAS, corroborando com o pressuposto de que por possuírem o gene *eae* e carregarem a região LEE, os isolados são capazes de produzir a lesão AE. Estudos indicam que aEPEC com o padrão de aderência ALL juntamente com o teste de FAS positivo representam importantes características de virulência em aEPEC, e indicam ser um agente com grande potencial de causar diarreia (SCALETSKY et al., 1999; GOMES et al., 2011). O único isolado de STEC portador da região LEE (P059-9, sorotipo O26:H11), também mostrou potencial em induzir a lesão AE, através do teste de FAS positivo.

A maioria dos isolados de *E. coli*, submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foi sensível às drogas testadas. No entanto, pudemos observar resistência à Ampicilina e ao Cotrimoxazol no grupo dos pacientes, e resistência à Ampicilina, ao Cotrimoxazol e à Gentamicina no grupo de controles. Resistência aos antibióticos Ampicilina e Cotrimoxazol é detectada frequentemente entre isolados de ECD no Brasil, por exemplo, em Recife, um estudo realizado em 2012, revelou de 88,9 e 44,4% dos isolados de EPEC estudados foram resistentes a Ampicilina e ao Cotrimoxazol, respectivamente (MOURA et al., 2012). No Peru foram encontradas resistências de 85,0% à Ampicilina e 79,0% ao Cotrimoxazol, isolados em maior frequência em isolados de EAEC provenientes de crianças diarreicas (OCHOA et al., 2009; OCHA et al., 2011). Um estudo realizado no Brasil com crianças que moram em regiões socioeconomicamente pouco desenvolvidas 31,0 e 27,0% dos isolados de ECD obtidos de crianças assintomáticas demonstraram resistência ao

Cotrimoxazol e a Ampicilina, respectivamente (SOUZA et al., 2009). Como observado em nosso estudo, Souza e colaboradores (SOUZA et al., 2009) detectaram que a maioria dos isolados de ECD resistentes a Ampicilina e ao Cotrimoxazol, era pertencente aos patótipos EAEC e EPEC. É importante lembrar que o uso indiscriminado de antibióticos orais pode alterar a microbiota residente tornando um hospedeiro susceptível à infecções, sendo que a não intervenção da microbiota poderia desempenhar um papel de extrema importância, dificultando o estabelecimento do patógeno e as manifestações clínicas decorrentes desta infecção (LOOFT, 2012).

6. CONCLUSÕES

⇒ Entre os patótipos de ECD estudados, EAEC e aEPEC foram os mais frequentes, entretanto, foram detectados em proporção similar entre os grupos estudados. STEC e ETEC foram detectados em apenas uma criança de cada grupo (diarreicas e saudáveis), sendo que nenhum patótipo de ECD pode ser individualmente associado com a doença diarreica.

⇒ A maioria das aEPEC aderentes, produziram o padrão ALL em células HeLa, sendo que, com exceção de um único isolado de aEPEC, todos os demais indicaram a capacidade de produzir a lesão AE através do teste de FAS, apontando para o seu potencial de interagir e modificar o citoesqueleto da célula hospedeira. Por outro lado, a maioria dos isolados de EAEC produziu o padrão AA, muito embora isolados aderindo em padrões não-determinados ou ainda não-aderentes tenham sido detectados.

⇒ Somente 26,5% dos isolados de EPEC pertencem aos sorogrupos clássicos de EPEC, enquanto que os isolados de STEC foram classificados nos sorotipos O26:H11 (STEC isolada de uma criança diarreica) e O119:H7 (STEC isolada de uma criança saudável).

⇒ Nos isolados de ECD estudados, pudemos observar resistência apenas à Ampicilina, ao Cotrimoxazol e à Gentamicina, entre os antibióticos testados.

⇒ Nossos dados revelam que ECD ainda representa um importante agente da doença diarreica entre crianças no município de Botucatu/SP, sendo EAEC e aEPEC os patótipos mais frequentes na população estudada, muito embora, outros estudos ainda se façam necessários para identificar quais os isolados realmente possam ser considerados patógenos verdadeiros, uma vez que todos os patótipos de ECD foram encontrados em proporções semelhantes entre crianças com diarreia e crianças saudáveis.

7. REFERÊNCIAS*

ABE, C. M.; TRABULSI, L. R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; MARTINEZ, M. B.; PIAZZA, R. M.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, aug. 2009.

AFSET, J. R.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 11, p. 1015-1019, nov. 2003.

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, n. 2, p. 145-150, feb. 2007.

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, n. 10, p. 3396-3399, oct. 2007.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, n. 4, p. 493-496, apr. 1966.

BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 5, p. 1506-1511, may. 1989.

BILGE, S. S.; CLAUSEN, C. R.; LAU, W.; MOSELEY, S. L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 8, p. 4281-4289, aug. 1989.

BORTOLINI, M. R.; TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; FRANKEL, G.; SPERANDIO, V. Lack of expression of bundle-forming pili in some clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is due to a conserved large deletion in the bfp operon. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, n. 1, p. 169-174, oct. 1999.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R. E.; WHO CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet.**, v. 365, n. 9465, p. 1147-1152, mar./apr. 2005.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; DOS SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, nov. 2007.

BÜHLER, H. F.; IGNOTTI, E.; NEVES, S. M. A. S.; HACON, S. S. Análise espacial de indicadores integrados de saúde e ambiente para morbimortalidade por diarreia infantil no Brasil, 2010. **Cad. Saúde Pública**, v. 30, n. 9, p. 1921-1934, set. 2014.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v. 36, n. 3, p. 289-311, may./jun. 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement**. CLSI document M100-S24. Wayne, Pa; 2014.

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, n. 1, p. 11-16, aug. 1996.

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 diarrhoea. **Lancet**, v. 337, n. 8736, p. 262-264, feb. 1991.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, n. 4, p. 822-880, oct. 2013.

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, n. 10, p. 415-4145, oct. 1997.

DONNENBERG, M. S.; GIRÓN, J. A.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Mol. Microbiol.**, v. 6, n. 22, p. 3427-3437, nov. 1992.

DONNENBERG, M. **Infecções causadas por *Escherichia coli* e outros bacilos entéricos gram-negativos**. Tradução Soraya Imon de Oliveira. Ontario: Decker Intellectual Properties Inc., 2011. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4663/infeccoes_causadas_por_escherichia_coli_e_outros_bacilos_entericos_gram_negativos_%E2%80%93_michael_s_donne.htm>. Acesso em: 25 set. 2014.

DOS SANTOS, L. F.; IRINO, K.; VAZ, T. M.; GUTH, B. E. Set of virulence genes and genetic relatedness of O113:H21 *Escherichia coli* strains isolated from the animal reservoir and human infections in Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, n. 6, p. 634-640, jun. 2010.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. **Human intestinal flora**. New York: Academic Press, 1974. p. 36-43.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 188, n. 11, p. 1685-1694, dec. 2003.

EWING, W. H.; EDWARDS, P. R. **Edwards & Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier, 1986, 536 p.

FANG, G. D.; LIMA, A. 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, n. 2, p. 137-144, aug 1995.

FLECKENSTEIN, J. M.; HARDWIDGE, P. R.; MUNSON, G. P.; RASKO, D. A.; SOMMERFELT, H.; STEINSLAND, H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 2, p. 89-98, feb. 2010.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C.; KELLER, R.; GOMES, T. A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 359-363, aug. 2005.

GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends Microbiol.**, v. 4, n. 11, p. 444-452, nov. 1996.

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

GOMES, T. A. T.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 2, p. 266-269, feb. 1989.

GOMES, T. A.; RASSI, V.; MACDONALD, K. L.; RAMOS, S.R.; TRABULSI, L. R.; VIEIRA, M. A.; GUTH, B. E.; CANDEIAS, J. A.; IVEY, C.; TOLEDO, M. R. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, n. 2, p. 331-337, aug. 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, n. 12, p. 3609-3613, dec. 1998.

GOMES, T. A. T.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. M. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, n. 10, p. 1851-1855, oct. 2004.

GOMES, T. A. T.; HERNANDES, R. T.; TORRES, A. G.; SALVADOR, F. A.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; IRINO, K.; SILVA, R. M.; VIEIRA, M. A. M. Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 9, p. 3334-3337, set. 2011.

GUTH, B. E.; LOPES DE SOUZA, R.; VAZ, T. M.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 535-536, may. 2002.

GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; GOMES, T. A.; CHINARELLI, S. H.; ROCHA, M. M.; DE CASTRO, A. F.; IRINO, K. Re-emergence of O103 : H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, n. 8, p. 805-806, aug. 2005.

HALE, T. L. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. **Microbiol. Rev.**, v. 55, n. 2, p. 206-224, jun. 1991.

HAO, R.; QIU, S.; WANG, Y.; YANG, G.; SU, W.; SONG, L.; ZHANG, J.; CHEN, J.; JIA, L.; WANG, L.; SONG, H. Quinolone-Resistant *Escherichia coli* O127a:K63 Serotype with an Extended-Spectrum-Beta-Lactamase Phenotype from a Food Poisoning Outbreak in China. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 7, p. 2450-2451, jul. 2012.

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

HARRIS, J. R.; WACHSMUTH, I. K.; DAVIS, B. R.; COHEN, M. L. High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. **Infect. Immun.**, v. 37, n. 3, p. 1295-1298, sep. 1982.

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, n. 2, p. 137-149, aug. 2009.

IRINO, K.; VAZ, T. M.; KATO, M. A.; NAVES, Z. V.; LARA, R. R.; MARCO, M. E.; ROCHA, M. M.; MOREIRA, T. P.; GOMES, T. A.; GUTH, B. E. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 4, p. 446-447, apr. 2002.

KAPER, J. B. The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and other attaching and effacing *E. coli*. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v. 51, p. 101-107, 1998.

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

KAPER, J. P. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 130–133, 1996.

KNUTTON, S.; PHILLIPS, A. D.; SMITH, H. R.; GROSS, R. J.; SHAW, R.; WATSON, P.; PRICE, E. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 1, p. 365-371, jan. 1989.

KOSEK M.; BERN C.; GUERRANT R.L. The global burden of diarrheal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ**, v. 81, n. 3, p. 197-204, jan. 2003.

LAN, R.; ALLES, M. C.; DONOHOE, K.; MARTINEZ, M. B.; REEVES, P. R. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella spp.* **Infect. Immun.**, v. 72, n. 9, p. 5080-5088, sep. 2004.

LEVINE, M. M.; ROBINS-BROWNE, R. M. Factors that explain excretion of enteric pathogens by persons without diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, n. s4, p. 303-311, dec. 2012.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Pediatr. Suppl.**, v. 81, n. 381, p. 39-44, sep. 1992.

LOOFT, T.; ALLEN, H. K. Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. **Gut Microbes.**, v. 3, n. 5, p. 463-467, sep./oct. 2012.

LOZER, D. M.; SOUZA, T. B.; MONFARDINI, M. V.; VICENTINI, F.; KITAGAWA, S. S.; SCALETSKY, I. C.; SPANO, L. C. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, p. 418, sep. 2013.

MCDANIEL, T. 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, n. 5, p. 1664-1668, feb. 1995.

MELLI, L. C.; WALDMAN, E. A. Temporal trends and inequality in under-5 mortality from diarrhea. **J. Pediatr.**, v. 85, n. 1, p. 21-27, jan./feb. 2009.

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, n. 3, p. 1340-1351, sep. 1983.

MORENO, A. C; FILHO, A. F.; GOMES, T. D. O. A.; RAMOS, S. T.; MONTEMOR, L. P.; TAVARES, V. C.; FILHO, L. D. O. S. S.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, n. 1, p. 50-57, jan. 2010.

MORIN, N.; SANTIAGO, A. E.; ERNST, R. K.; GUILLOT, S. J.; NATARO, J. P. Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 81, n. 1, p. 122–132, jan. 2013.

MOURA, M. R. S. A. L.; MELLO, M. J. G.; CALÁBRIA, W. B.; GERMANO, E. M.; MAGGI, R. R. S.; CORREIA, J. B. Frequência de *Escherichia coli* e sua sensibilidade aos antimicrobianos em menores de cinco anos hospitalizados por diarreia aguda. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 12, n. 2, p. 173-182, abr./jun. 2012.

MÜLLER, D.; GREUNE, L.; HEUSIPP, G.; KARCH, H.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; SCHMIDT, M. A. 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, n. 10, p. 3380-3390, may. 2007.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, n. 9, p. 829-831, sep. 1987.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. *AggR*, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 15, p. 4691-4699, aug. 1994.

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

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 251-61, apr.-jun. 1998.

NATARO, J. P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W. C.; HEIMER, R.; TIRRELL, S.; EDBERG, S. C.; BRADEN, C. R.; GLENN MORRIS JR., J.; HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 4, p. 402-407, aug. 2006.

NEOG, B. K.; BARMAN, N. N.; BORA, D. P.; DEY, S. C.; CHAKRABORTY, A. Experimental infection of pigs with group A rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* in India: gross, histopathological and immunopathological study. **Vet. Ital.**, v. 47, n. 2, p. 117-128, 2011.

NETER, E.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O.; GINO, R. M.; GORZYNSKI, E. A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, n. 6, p. 801-808, dec. 1995.

NOWROUZIAN, F.; HESSELMAR, B.; SAALMAN, R.; STRANNEGARD, I. L.; ABERG, N.; WOLD, A. E.; ADLERBERTH, I. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. **Pediatr. Res.**, v. 54, n. 1, p. 8-14, jul. 2003.

NUNES, M. D. O. R.; MAGALHÃES, P. P.; MACÊDO, A. D. A. S.; FRANCO, R. T.; PENNA, F. J.; MENDES, E. N. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhea and controls in Teresina/PI, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, n. 1, p. 43-47, jan. 2012.

OCHOA, T. J.; ECKER, L.; BARLETTA, F.; MISPIRETA, M. L.; GIL, A. I.; CONTRERAS, C.; MOLINA, M.; AMEMIYA, I.; VERASTEGUI, H.; HALL, E. R.; CLEARY, T. G.; LANATA, C. F. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from Periurban areas in Lima, Peru. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, n. 11, p. 1694-1702, dec. 2009.

OCHOA, T. J.; MERCADO, E. H.; DURAND, D.; RIVERA, F. P.; MOSQUITO, S.; CONTRERAS, C.; RIVEROS, M.; LLUQUE, A.; BARLETTA, F.; PRADA, A.; RUIZ, J. Frequency and pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in Peruvian children with and without diarrhea. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica.**, v. 28, n. 1, p. 13-20, mar. 2011.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, G. F.; MATOS, N. B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P. A.; SILVA, L. H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 4, p. 507-517, apr. 2006.

OSAWA, K.; RAHARJO, D.; WASITO, E. B.; HARIJONO, S.; SHIGEMURA, K.; OSAWA, R.; SUDARMO, S. M.; IJIMA, Y.; SHIRAKAWA, T. Frequency of diarrheagenic *Escherichia coli* among children in Surabaya, Indonesia. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 66, n. 5, p. 446-448, 2013.

PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E. G.; BRESEE, J. S.; MILLER, M. A.; GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 5, p. 565-572, may. 2003.

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

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 2, p. 598-602, feb. 1998a.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 450-479, jul. 1998b.

PAWLOWSKI, S. W.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1874-1886, may 2009.

PIAZZA, R. M.; DELANNOY, S.; FACH, P.; SARIDAKIS, H. O.; PEDROSO, M. Z.; ROCHA, L. B.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; BEUTIN, L.; GUTH, B. E. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* O26:H8 among diarrheagenic *E. coli* O26 strains isolated in Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, n. 22, p. 6847-6854, nov. 2013.

PITONDO-SILVA, A.; NAKAZATO, G.; FALCÃO, J. P.; IRINO, K.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. L.; HERNANDES, R. T. Phenotypic and genetic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal children in the Ribeirão Preto metropolitan area, São Paulo State, Brazil. **APMIS.**, v. 123, n. 2, p. 128-135, feb. 2015.

QADRI, F.; SVENNERHOLM, A. M.; FARUQUE, A. S.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 3, p. 465-483, jul. 2005.

REID, S. D.; BETTING, D. J.; WHITTAM, T. S. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 8, p. 2719-2722, aug. 1999.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, 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, n. 12, p. 681-685, mar. 1983.

ROBINS-BROWNE, R. M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Rev. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 28-53, jan./feb. 1987.

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, 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, n. 7, p. 2680-2686, jul. 1996.

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, São Paulo State, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 11, p. 1311-1318, nov. 2002.

SCALETISKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, n. 2, p. 534-536, aug. 1984.

SCALETISKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; MORAIS, M. B.; CARVALHO, R. L.; SILVA, R. M.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U. Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea. **Arq. Gastroenterol.**, v. 36, n. 1, p. 54-60, mar. 1999.

SCALETISKY, I. C.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, H. S.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 645-648, feb. 2002.

SCALETISKY, I. C.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P.; MORAIS, M. B. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 11, p. 3756-3759, nov. 2009.

SCALETISKY, I. C.; ARANDA, K. R.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 302-306, jan. 2010.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 701-705, mar. 1995.

SCHULTSZ C.; POOL G.J.; VAN KETEL R.; DE WEVER B.; SPEELMAN P.; DANKERT J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 10, p. 2393-2397, oct. 1994.

SIEGLER, R. L.; OBRIG, T. G.; PYSHER, T. J.; TESH, V. L.; DENKERS, N. D.; TAYLOR, F. B. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. **Pediatr. Nephrol.**, v. 18, n. 2, p. 92-96, feb. 2003.

SOUZA, E. C.; MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R.; MUKAI, L.; GILIO, A. E.; RACZ, M. L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Etiologic profile of acute diarrhea in children in São Paulo. **J. Pediatr.**, v. 78, n. 1, p. 31-38, jan./feb. 2002.

SOUZA, T. B.; MORAIS, M. B.; TAHAN, S.; MELLI, L. C.; RODRIGUES, M. S.; SCALETSKY, I. C. High prevalence of antimicrobial drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in asymptomatic children living in an urban slum. **J. Infect.**, v. 59, n. 4, p. 247-251, oct. 2009.

SPANO L. C.; SADOVSKY A. D.; SEGUI P. N.; SAICK K. W.; KITAGAWA S. M.; PEREIRA F. E.; FAGUNDES-NETO U.; SCALETSKY I. C. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, n. 3, p. 359-363, mar. 2008.

TADDEI, C. R.; FASANO, A.; FERREIRA, A. J.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 250, n. 2, p. 263-269, sep. 2005.

TENNANT, S. M.; TAUSCHEK, M.; AZZOPARDI, K.; BIGHAM, A.; BENNETT-WOOD, V.; HARTLAND, E. L.; QI, W.; WHITTAM, T. S.; ROBINS-BROWNE, R. M. Characterization of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 117, jun. 2009.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. EPM-modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Rev. Microbiol.**, v. 13, n. 4, p. 309-315, 1982a.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. MILi-um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.**, v. 13, n. 3, p. 230-235, 1982b.

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, n. 6, p. 2669-2671, jun. 2003.

TORNIEPORTH, N. G.; JOHN, J.; SALGADO, K.; DE JESUS, P.; LATHAM, E.; MELO, M. C.; GUNZBURG, S. T.; RILEY, L. W. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 5, p. 1371-1374, may. 1995.

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

VAN DEN BELD, M. J.; REUBSAET, F. A. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 31, n. 6, p. 899-904, jun. 2012.

VAZ, T. M.; IRINO, K.; KATO, M. A.; DIAS, A. M.; GOMES, T. A.; MEDEIROS, M. I.; ROCHA, M.; GUTH, B. E. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 903-905, feb. 2004.

VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C.; DIAS, A. M.; RAMOS, S. R.; FRANKEL, G.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic E. coli (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 5, p. 762-772, mar. 2001.

VIEIRA, M. A. M.; SALVADOR, F. A.; SILVA, R. M.; IRINO, K.; VAZ, T. M.; ROCKSTROH, A. C.; GUTH, B. E.; GOME,S T.A.T. Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 4, n. 4, p. 1452-1455, apr 2010.

WILLER, E. M.; LIMA, R. L.; GIUGLIANO, L. G. In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. **BMC Microbiol.**, v. 4, p. 18, abr. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Improving diarrhea estimates. Child and adolescent health and development.** Geneva: World Health Organization, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhea: why children are still dying and what can be done.** New York: United Nations Children's Fund, WHO Press, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Short-term effects of breastfeeding: a systematic review on the benefits of breastfeeding on diarrhea and pneumonia mortality.** Geneva: WHO, 2013.

ZAMBONI, A.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 1058-1063, mar. 2004.

ANEXO 1



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distribuição Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.518-870
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de outubro de 2.012

OF. 461/2012


Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez
Departamento de Micro/Imuno do
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezado Dr. Rodrigo,

De ordem do Senhor Coordenador, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4347-2012) "Prevalência e caracterização fenotípica e molecular de amostras de Escherichia coli diarreiogênica isoladas de crianças com e sem diarreia na cidade Botucatu, São Paulo", a ser conduzido por Vossa Senhoria, com a colaboração do Prof. Dr. José Maurício Sforzin, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01/10/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

